

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-301893

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

(51)IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8619-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
5/10				
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		7236-4B	5/ 00	B
審査請求 未請求 請求項の数11(全 36 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-3399

(22)出願日 平成4年(1992)1月10日

(31)優先権主張番号 特願平3-20860

(32)優先日 平3(1991)2月14日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平3-224454

(32)優先日 平3(1991)9月4日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 成尾 憲一

兵庫県三田市南が丘1丁目1番2号

(72)発明者 瀬古 智佐子

大阪府高槻市塚原1丁目7番9-306号

(72)発明者 黒川 勉

兵庫県川西市水明台1丁目1番地の50

(72)発明者 近藤 達也

東京都文京区本駒込5丁目4番6-1201号

(74)代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

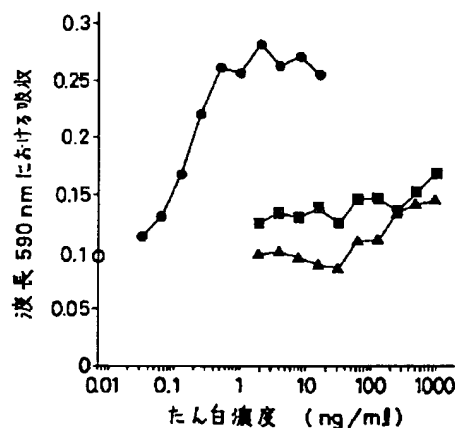
(54)【発明の名称】 グリア活性化因子およびその製造法

(57)【要約】

【目的】グリア細胞に特異的に増殖促進および栄養活性作用を有する新規な因子を見出すと共に、このものを効率よく製造する方法を提供する。

【構成】ヒト由来グリオーマ細胞株を培養した細胞培養上清から、ラット脳細胞からのグリア細胞増殖活性を指標としてグリア活性化成長因子を単離、精製し、それをコードするcDNAの塩基配列、それから推定されるアミノ酸配列を解明すると共に、遺伝子工学的にGAFを発現した。

【効果】本発明で得られたグリア活性化因子は新規な蛋白質で、グリア細胞、線維芽細胞に対し増殖活性を有し、脳疾患改善薬等の医薬として用いることが期待できる。



▲ : rhGAF 添加群

■ : rhGAF およびヘパリン (20 μg/ml) 添加群

● : bFGF 添加群

○ : 無添加群

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子。

【請求項2】 グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である請求項1記載のグリア活性化因子。

【請求項3】 アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または該因子作用を有するそのムテイン。

【請求項4】 アミノ酸配列：

(Met)n-X<sub>1</sub>-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp -X<sub>2</sub>

〔ただしnは0または1を、X<sub>1</sub> は Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその断片

を、X<sub>2</sub> は Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活性化因子。

【請求項5】 アミノ酸配列：

(Met)n X<sub>3</sub> Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただしnは0または1を、X<sub>3</sub> は Ala Pro もしくは Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活

性化因子。

【請求項6】 グリア活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含有するDNA。

【請求項7】 ポリヌクレオチドが塩基配列：

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC

AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGCGTGA CAGTGGACTC TACCTCGGA TGAATGAGAA  
 GGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。 【請求項8】ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y<sub>1</sub>-TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
 AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGCGTGA CAGTGGACTC TACCTCGGA TGAATGAGAA  
 GGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC-Y<sub>2</sub>

〔ただし、Y<sub>1</sub>は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAATATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCGGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTAAAGT GACCACTGG GTCAGTCCGA AGCA  
 GGGGG CTCCCAGGG GACCCGAGT CACGGAC またはその断  
 片を、Y<sub>2</sub>はAAAAGTAC CTGAACTGTA TAAGGATATT CTAAGCCAAA

GT またはその断片を、それぞれ示す〕ないしその5'末端に開始コドンATGを含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項9】ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y<sub>3</sub>-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
 AGCAGGGGG CTCCCAGGG GACCCGAGT CACGCACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
 AGTGGGCTG GTCAGCATTG GAGGCGTGA CAGTGGACTC TACCTCGGA TGAATGAGAA  
 GGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACTGTA  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

〔ただし、Y<sub>3</sub>は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAATATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCGGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTAA またはその断片を示す〕ないしその5'末端に開始コドンATGを含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項10】請求項6記載のDNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項11】請求項10記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該因子の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はグリオーマ細胞培養液より得られ、グリア細胞、線維芽細胞等に対して増殖促進作用を示す、新規なポリペプチドであるグリア活性化因子、該因子をコードするDNA、および該因子製造のための組換えDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞成長因子は、多種のものが発見、研究され、活用されてきている（細胞成長因子 part II、

日本組織培養学会編、1987、朝倉書店）。たとえば、上皮細胞成長因子（EGF, Epidermal Growth Factor）、血小板由来成長因子（PDGF, Platelet-Derived Growth Factor）や酸性あるいは塩基性線維芽細胞増殖因子（aFGFもしくはbFGF, acidic or basic Fibroblast Growth Factor）などである。これらは、いずれも線維芽細胞株の増殖促進を指標として単離されてきたものであり、その作用スペクトラムは広いが、特異性に乏しい。近年、機能分化した細胞に特異的に作用する増殖因子を探す努力が試みられつつあり、ケラチノサイト成長因子（KGF Keratinocyte Growth Factor）、肝実質細胞成長因子（HGF Hepatocyte Growth Factor）等が単離され、その特異的な作用スペクトラムから疾患への適用が期待されている。脳神経細胞は、生後すぐに増殖を止め、以後、その数を減じて行く。近年、老年での脳疾患、特に痴呆症が問題となってきた。これは、原因不明、あるいは損傷等による脳神経細胞の死滅によることが判ってきた。このような脳神経細胞の死滅を防ぎ止めるためには、これらの細胞を賦活化することが必要である。グリア細胞は脳内で神経細胞

のまわりをとり囲んでおり、脳神経細胞の生存を支持している。グリア細胞が放出しているであろう神経栄養因子の探索は、きわめて広く行われてきたが、まだ決定的な因子は見出されていない。グリア細胞は、その形態、および働きから、I型アストロサイト、II型アストロサイト、オリゴデンドロサイト等に分類されている。これらのグリア細胞を賦活化することは、それ自身では分裂増殖することのない脳神経細胞を賦活、維持することとなり、脳疾患改善の重要な方策となってきた。このため、脳神経細胞のみならず、グリア細胞に作用する増殖因子は渴望されてきた。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、グリア細胞に作用する増殖因子は、脳神経細胞の賦活化を目ざして、探索されており、PDGF、FGF等が、グリア細胞に対しても増殖促進作用を示すことが知られている。しかし、これらの因子は、他の細胞種に対する増殖促進作用も強く、思うようには医薬品として使用され得てはいない。グリア細胞に、より特異的に作用している因子を探し、これを医薬品として活用することは脳疾患の改善の方策として期待されていたが、現在まで、このような因子は得られていない。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】一般的に、多くの細胞は自分自身の増殖を促す増殖促進因子を産生していることが知られるようになってきた。そこで本発明者らは、グリア細胞が産生する、グリア細胞に対する増殖促進因子について探索した。この結果、グリア細胞が該因子を産生していることを見出したが、ヒト・グリア細胞をヒトから採取することはできず、また、一般にそのままで維

持、培養できる細胞はない。そこで、グリア細胞としての形質を残しているグリオーマ細胞株を用いて検討を重ね、この因子（グリア活性化因子、GliaActivating Factor、以下GAFと略称することがある。）を単離、精製した。

【0005】一方、ヒトグリオーマ細胞より得られたGAFは極めて微量であり、医薬品として、あるいは研究材料として使用するため十分な量を得るには、大量のグリア細胞を培養するための時間と労力が必要とされる。そこで本発明者等は、さらにGAFをより簡便に得るために、GAFをコードするポリヌクレオチドを同定し、該ポリヌクレオチドを用いて近年発展してきた組み換えDNA技術を応用することにより、この問題を解決することも考えた。すなわち、本発明者らは、GAFのN末端側アミノ酸配列を解析し、この配列を基にオリゴヌクレオチドプローブを合成した。ヒトグリオーマ細胞NM C-G1、あるいはヒト包皮由来初代培養細胞のmRNAより作製したcDNAライブラリーについて上記プローブを用いて検索し、ヒトGAF cDNAをクローニングした。さらに、該cDNAを含む組換えDNAを構築し、該DNAで形質転換された形質転換体を培養すると、ヒトGAFが生産されることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき、さらに研究した結果、本発明を完成した。

【0006】本発明は（1）グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子、（2）グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である上記（1）記載のグリア活性化因子、

#### （3）アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または

該因子作用を有するそのムテイン、

#### （4）アミノ酸配列：

(Met)n-X<sub>1</sub>-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg

Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp -X<sub>2</sub>

[ただしnは0または1を、X<sub>1</sub> は Ala Pro Leu Gly Glu  
Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro P  
he Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val  
Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly G  
ly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその

断片を、X<sub>2</sub> は Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile  
Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す] で  
示されるポリペプチドからなる上記 (3) 記載のグリア  
活性化因子、

(5) アミノ酸配列:

(Met)n X<sub>3</sub> Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

[ただしnは0または1を、X<sub>3</sub> は Ala Pro もしくは Le  
u Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala V  
al Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser

Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す] で示  
されるポリペプチドからなる上記 (3) 記載のグリア活  
性化因子、

(6) アミノ酸配列:

X<sub>1</sub>' X<sub>2</sub>' Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

[ただし、X<sub>1</sub>' はMet または Met Ala Pro を、X<sub>2</sub>' は  
Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala  
Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Se  
r Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す] で

示されるポリペプチドからなる上記 (5) 記載のグリア  
活性化因子、(7) グリア活性化因子をコードするポリ  
ヌクレオチドを含有するDNA、

(8) ポリヌクレオチドが塩基配列:

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
AGTGGGCGTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTTGA  
AGAAAATCGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチ

ドである上記 (7) 記載のDNA、

(9) ポリヌクレオチドが塩基配列:

Y<sub>1</sub>-TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
 AGTGGGCCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC-Y<sub>2</sub>

〔ただし、Y<sub>1</sub>は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAATATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCGGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTAAAGT GACCACTGG GTCAGTCCGA AGCA  
 GGGGG CTCCCAGGG GACCCGAGT CACGGAC またはその断

片を、Y<sub>2</sub>はAAAGTAC CTGAAGTGA TAAGGATATT CTAAGCCAAA  
 GT またはその断片を、それぞれ示す〕ないしその5'  
 末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示されるポ  
 リヌクレオチドである上記 (7) 記載のDNA、

(10) ポリヌクレオチドが塩基配列:

Y<sub>3</sub>-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
 AGCAGGGGGG CTCCCAGGG GACCCGAGT CACGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
 AGTGGGCCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAAGTGA  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

〔ただし、Y<sub>3</sub>は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAATATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCGGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTAA またはその断片を示す〕ないし

その5' 末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示  
 されるポリヌクレオチドである上記 (7) 記載のDNA、

(11) ポリヌクレオチドが塩基配列:

Y'-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
 AGCAGGGGGG CTCCCAGGG GACCCGAGT CACGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
 AGTGGGCCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAAGTGA  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA

〔ただし、Y'は AT GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAATATTT  
 CGGTGTGCAG GATGCGGTACCGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCG  
 GTGG ACAGCCCGGT TTTGTAA またはその断片を示す〕で  
 示されるポリヌクレオチドである上記 (10) 記載のDNA、  
 (12) 上記 (7) 記載のDNAを含有するベク  
 ターで形質転換された形質転換体、(13) 上記 (1  
 2) 記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリア  
 活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを  
 特徴とする該因子の製造法に関するものである。

【0007】本発明のGAFは第一にヒト由来グリオ  
 マ細胞株または上記 (6) の形質転換体を培養して得ら  
 れた培養液上清からグリア細胞増殖活性を指標として単  
 離された蛋白質からなり、かつグリア細胞、線維芽細胞

に増殖促進活性を有するグリア活性化因子を要旨とす  
 る。更に本発明のGAFは、次の特徴を有する:

(a) ヘパリン親和性を有する (ヘパリンセファロース  
 カラムより0.4~0.9M食塩濃度で溶出され  
 る。)

(b) 分子量: SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
 法で測定して、25000、29000、30000の  
 三種の分子種がある。

(c) 活性の安定性: 100℃、5分の熱処理で活性を  
 失い、またpH2、30分処理で部分的に活性を失う。

(d) 抗原性: 血小板由来成長因子 (PDGF)、酸性  
 線維芽細胞増殖因子 (aFGF)、塩基性線維芽細胞増  
 殖因子 (bFGF) との間に免疫学的交差性を示さな

い。

(e) 生物活性：グリア細胞、線維芽細胞、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC-12細胞、に対して増殖促進活性を示す。

本発明のGAFは、分子量25000、29000、30000の三種の分子種があり、それぞれの分子種が一つの蛋白質であり、いずれも同等の生物活性を有していると認められる。

【0008】本発明において、さらにヒト由来グリオーマ細胞株または上記(6)の形質転換体を培養し、その培養上清よりグリア活性化因子を採取し、それを精製することを特徴とするGAFの製造法が提供される。本発明によるGAFを得るための該因子を含む細胞培養上清は、グリオーマ細胞、例えばヒトグリオーマ細胞NMC-G1の培養により得られる。グリオーマ細胞の培養には静置培養、ローラボトル培養、セルファクトリーあるいは懸濁培養等のいかなる方法も用いられ得るが、好ましくはローラボトル培養が用いられる。培地としては動物細胞用の培地、例えば、MEM培地、[サイエンス(Science), 122, 501(1952)]、DMEM培地[ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)]、RPMI 1640培地[ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)]、199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1(1950)]などが挙げられ、好ましくは、DMEM培地が用いられる。培養にはこれにさらに約10~20%の胎児牛血清を添加しても良い。pHは約6~8であるのが好ましい。培養温度は30~40℃、好ましくは37℃で約24~100時間行い、必要に応じて培地交換を行う。

【0009】上記培養液よりGAF蛋白を分離精製するには、自体公知の分離精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動法などの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。さらに具体的には、上記培養液を遠心分離して夾雑沈澱物を除いた後、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーに付し、GAF蛋白を吸着、溶出することにより、効率よく該蛋白の濃縮、精製を行うことができる。

【0010】セファクリルS-200等を担体としたゲルろ過もGAF蛋白の精製に有効である。例えば、ヘパリンセファロースカラムで濃縮されたGAF蛋白を含む

溶出液を、さらに限外ろ過法などを用いて濃縮してセファクリルS-200カラムを用いるクロマトグラフィーに付し、中性付近の緩衝液で溶出する。CMセルロース等の酸性樹脂のカラムクロマトグラフィーも有効である。たとえば、弱酸性緩衝液で平衡化したカラムを用いて、同じ緩衝液で透析した試料をクロマトグラフィーに付し、NaCl等の塩の直線濃度勾配溶出を行うことができる。また、ヘパリンセファロースを担体としたアフィニティークロマトグラフィーは極めて有効である。例えば、中性付近のトリス塩酸あるいはトリスリン酸などの緩衝液で平衡化したヘパリンセファロースカラムを用いて、GAF蛋白を含む溶液をクロマトグラフィーに付し、十分洗った後、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことによりGAF蛋白を精製することができる。特に高速液体クロマトグラフィー用に開発されたヘパリンカラム(例えばShodex AFpak HR-894、昭和電工製など)は有効であり、前記ヘパリンセファロースと同様に利用することが出来る。逆相高速液体クロマトグラフィーは、多くの蛋白の精製に威力を発揮しており、GAF蛋白もこの担体を用いて精製することができる。例えば試料を0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液としてカラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸に加えたアセトニトリルの濃度勾配によって溶出を行うことができる。上記の操作を適宜、組み合わせることによりGAF蛋白を均一な標品として回収することができる。また、精製過程、あるいは保存過程での微量のディタージェントの共存は、標品の担体、あるいは容器への非特異的吸着を防ぐのに好適である。ディタージェントとしてはCHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、NP-40、Triton X100などが挙げられるが、特にCHAPSが好ましい。

【0011】培養上清中および精製過程でのGAF蛋白の活性は、例えばラット胎児(19日令)脳より分離採取した初代培養グリア細胞、あるいは公知のBALB/c3T3細胞に対する<sup>3</sup>H-チミジンのとりこみを指標とした増殖促進効果などにより測定することができる。得られた精製標品は透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに血清アルブミンなどを添加して保存することも好適である。得られた精製標品を用いて、GAF蛋白の糖鎖構造を調べることができる。この目的のためにはレクチンを用いたプロットティングや糖鎖分解酵素などが使用され得る。得られた精製標品は、そのままN末端側アミノ酸配列を調べることができる。また、蛋白分解酵素、たとえば、トリプシン、リジレンドペプチダーゼ、V8プロテアーゼ等で分解処理したのち、生じたペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分取し、それぞれについて、アミノ酸配列を調べることができる。アミノ酸配列の決定には自動アミノ酸配列分析計(例えばモデル470A アプライド

バイオシステムズ、米国) が特に有効に使用される。

【0012】得られたアミノ酸配列をもとに、対応する核酸の塩基配列を求め、オリゴヌクレオチドを合成してGAF蛋白をコードしているcDNAのクローニングに用いることができる。

【0013】cDNAを得られれば、このcDNAを微生物、例えば大腸菌、枯草菌、イーストなどで発現させて、GAF蛋白をより容易に得ることができる。また、発現宿主としては動物培養細胞も用いられ、糖鎖構造が必要な場合には、きわめて好適な宿主として用いられることとなる。この様に遺伝子工学的手法を用いることにより、より容易にGAF蛋白の大量生産への道を開くことができる。この様な遺伝子工学的手法によりGAFを得る場合、発現宿主の相違または突然変異等によるアミノ酸の欠損、置換等によりここに示すアミノ酸配列が異なることがあるが、このような蛋白であっても、GAF因子作用を有するものであれば、本発明のGAFに含まれる。また、グリオーマ細胞の培養上清から精製されたGAFに、N末端側アミノ酸配列が欠失した分子種が存在し、それらが同じ比活性を有していたことからわかる様に、GAFのアミノ酸配列の一部を欠失させる、あるいは他の配列を付加する、さらにはアミノ酸配列の一部を置換しても同等の活性を保持させることは可能である。遺伝子工学的手法を用いて、このような変異GAF蛋白をつくり、熱や酸に対する安定性を高めること等も可能である。

【0014】本発明のヒトグリア活性化因子(1)のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば(イ)ヒトグリア活性化因子(1)を培養上清より単離精製し、N末端側アミノ酸配列を分析する、(ロ)得られたアミノ酸配列を基に、それをコードするオリゴヌクレオチドプローブを合成する、(ハ)ヒトグリア活性化因子をコードするRNAを細胞より抽出し、(ニ)該mRNAから単鎖の相補DNA(cDNA)を、次いで二重鎖DNAを合成し、(ホ)該相補DNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ヘ)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(ト)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばDNAプローブを用いたハイブリダイゼーション法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(チ)その組み換えDNAから目的とするクローン化DNAを切り出し、(リ)該クローン化DNAまたはその一部を発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することができる。

【0015】ヒトGAFをコードするmRNAは、種々のグリア活性化因子産生細胞、例えばヒトグリオーマ細胞、あるいはヒト線維芽細胞などから得る事ができる。該ヒトグリオーマ細胞としてはNMC-G1、またヒト線維芽細胞としてはWI-38(ATCC番号CCL-

75)などが挙げられる。上記細胞NMC-G1は平成2年10月31日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50281として、また平成3年2月21日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM BP-3294としてそれぞれ寄託されており、またWI-38はジ・アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(The American Type Culture Collection)発行のカタログ・オブ・セル・ラインズ・アンド・ハイブリドーマズ 第5版(Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, 5th edition), 1985に掲載されている。

【0016】GAF産生細胞からRNAを調製する方法としては、グアニジンチオシアネート法[(ジェー・エム・チルグウィン(J.M. Chirgwin)ら、バイオケミストリー(Biochemistry), 18, 5294(1979)]などが挙げられる。このようにして得られたmRNAを鋳型とし、逆転写酵素を用いて、例えば岡山(H. Okayama)らの方法[モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology) 2, 161(1982)および同誌 3, 280(1983)]に従いcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のpBR322[ジーン(gene), 2, 95(1977)], pBR325[ジーン, 4, 121(1978)], pUC12[ジーン, 19, 259(1982)], pUC13[ジーン, 19, 259(1982)], pUC118, pUC119, 枯草菌由来のpUB110[バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication), 112, 678(1983)]などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれをも用いることができる。

【0017】プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、ティー・マニアティス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), 第239頁(1982)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、たとえばヒューン(Hyunh, T. V.)らの方法[ディー・エヌ・エークローニング ア プラクティカル アプローチ(DNA Cloning, A Practical Approach) 1, 49(1985)]などが挙げられる。上記cDNAが組み込まれたプラスミドの例としては、ヒト正常2倍体細胞mRNAより合成したcDNAをベクター、たとえばpCDベクター[Okayama ら、モレキュラー・セル・バイオロジー(Molecular Cell Biology), 3, 280(1983)参照]を宿主(たとえば、大腸菌x1776)に組み込んで作成してもよい。

【0018】このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリキア(Escherichia) 属菌、バチルス(Bacillus) 属菌などに導入する。上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ(Escheri-



chia coli) K12DH1 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 60, 160 (1968)], M103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)], J A 221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 1 20, 517 (1978)], HB 101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー 41, 459 (1969)], C 600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)] などが挙げられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス (*Bacillus subtilis*) M1114 (ジーン, 24, 255 (1983), 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) 95, 87 (1984)] などが挙げられる。

【0019】プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばティー・マニアティス (T. Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory), 第249頁 (1982) に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法などが挙げられる。このようにして得られた形質転換体中からGAFのアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、自体公知の方法、たとえばコロニー・ハイブリダイゼーション法 [ジーン (Gene) 10, 63 (1980)] およびDNA塩基配列決定法 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 74, 560 (1977), ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)] を用い求めるクローンを選出する。このようにして、クローン化されたGAFをコードする塩基配列を含有するDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

【0020】上記クローン化されたGAFをコードするcDNAを有するプラスミドは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することが出来る。クローン化されたcDNAから発現させたい領域を切り出し、発現に適したピークル (ベクター) 中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来プラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194), 酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15), あるいはλファージなどのバクテリオファージおよびレトロウィルス、ワクシニアウィルスなどの動物ウィルスなどが挙げられる。

【0021】該cDNAはその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA, TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもで

きる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、T7プロモーター, trpプロモーター, lacプロモーター, recAプロモーター, λPLプロモーター, lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター, PGKプロモーター, GAPプロモーター, ADHプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがT7プロモーターまたはtrpプロモーターであることが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーターなどが挙げられ、とりわけSV40由来のプロモーターが好ましい。

【0022】このようにして構築されたGAFをコードするcDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、前記したものと同様のものが挙げられる。上記酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22R<sup>+</sup>, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。

【0023】上記エシェリキア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69, 2110 (1972) やジーン, 17, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばウイルス学 (Virology) 52, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。

【0024】このようにして、GAFをコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。その一例としては、たとえば後述の実施例5で得られた *Escherichia coli* DH-1/pGAF1が挙げられ、該微生物は、平成3年8月28日に財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO

15217として寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に平成3年9月2日から受託番号FERM BP-3547としてそれぞれ寄託されている。また実施例8で得られた*Escherichia coli* MM294(DE3)/pLysS, pETGAF1は、平成3年12月3日に財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 15248として寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に平成3年12月24日から受託番号FERM BP-3689としてそれぞれ寄託されている。

【0025】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地[ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972]が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリル・アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0026】宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー(Burkholder)最小培地[Bostian, K. L. ら, 「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77, 4505(1980)」が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地[サイエンス(Science) 122, 501(1952)], DMEM培地[ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)], RPMI 1640培地[ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199, 51

9(1967)], 199培地[プロシーディング・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine) 73, 1(1950)]などが挙げられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約1.5~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0027】上記培養物からGAFを分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。GAFを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを緩衝液あるいは塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤を含む液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離によりGAFを得る方法などが適宜用い得る。

【0028】抽出液よりのGAFの精製は通常の方法が用いられ得る。例えば硫酸による分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過など、いずれを用いてもよい。また精製過程での蛋白分解酵素阻害剤の共存は、分解を受けていない蛋白を得るのに好適である。また精製過程での緩和な表面活性剤の共存は、収量を高めるのに好都合である。例えばCHAPSなどは好ましい。天然型GAFの精製に用いたヘパリンカラムは極めて有効に使用される。これらを組み合わせることにより、均一なGAF蛋白を得ることができる。ここに製造されるGAFはグリア細胞に対する増殖促進活性を有するので、脳の損傷等の治療促進剤として用いることが出来る。また脳神経細胞損傷による疾患、脳浮腫、アルツハイマー病、老人性痴呆、さらには糖尿病性網膜症などへの応用もできる。他の細胞への作用に比べて、グリア細胞に対する作用が強いので、グリア細胞を特異的に賦活することが期待できる。また、線維芽細胞に対する増殖促進作用を有することから、火傷、創傷、術後組織潰瘍、消化器潰瘍の治療促進剤として用いることができる。また、GAFは巨核芽球に作用して、この細胞を増殖分化させ、血小板増加を促すことが見出された。他の造血系あるいは免疫担当の細胞の増殖も促進するものと考えられる。特に脳内では免疫担当細胞としてミクログリアが存在しており、この細胞の賦活にも関与しているものと考えられる。この点からも脳損傷の治療改善に用いることができよう。GAFはヒトさい帯由来血管内皮細胞にはほとんど作用しなかったが、血管平滑筋細胞には増殖促進作用を有している。

【0029】さらに他の増殖因子、aFGF、bFGF、IGFなどと同様に骨形成を促進する作用も期待され、骨折や骨粗鬆症への適用も考えられる。GAF cDNAはbFGF、TGF-α、PDGFなどと同様に線維芽細胞を形質転換することができる。この性質から、GAFの上昇が細胞内での転写グリオーマの悪性化

の一因となっていることも考えられる。従って、脳腫瘍ではGAFの産生が促進されていると考えられるので、GAFおよびその抗体さらにはGAF cDNAは腫瘍の診断にも有用となろう。またグリア細胞の培養研究には、有効な因子として活用され得る。

【0030】本発明のGAFを医薬として用いるには、そのまま粉末として、または他の薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物（例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏など）として、温血哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ）に対して非経口的または経口的に安全に投与することができる。注射剤の製剤化はたとえば生理食塩水またはブドウ糖やその他の補助薬を含む水溶液を用い、常法に従って行なわれる。錠剤、カプセル剤等の医薬組成物も常法に従って調製しうる。さらに、医薬組成物としての注射剤、液剤、錠剤、カプセル剤等を製造する際には、無菌条件下で行なう。本発明のGAFを上記した医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与ルート、症状などを考慮して、1回約0.5ngないし50μg/kg、1日量約1ngないし100μg/kgの中から適量を選んで投与される。また、本発明のGAFを細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、培地1リットルあたり約0.01~10μgさらに好ましくは約0.1~10μgとなるように培地に加えることが好ましい。

【0031】本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

【0032】DNA : デオキシリボ核酸

cDNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャーリボ核酸

dATP : デオキシアデノシン三リン酸

dTTP : デオキシチミジン三リン酸

dGTP : デオキシグアノシン三リン酸

dCTP : デオキシシチジン三リン酸

ATP : アデノシン三リン酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

GlyまたはG : グリシン

AlaまたはA : アラニン

ValまたはV : バリン

LeuまたはL : ロイシン

IleまたはI : イソロイシン

SerまたはS : セリン

ThrまたはT : スレオニン

CysまたはC : システイン

MetまたはM : メチオニン

GluまたはE : グルタミン酸

AspまたはD : アスパラギン酸

LysまたはK : リジン

ArgまたはR : アルギニン

HisまたはH : ヒスチジン

PheまたはF : フェニールアラニン

TyrまたはY : チロシン

TrpまたはW : トリプトファン

ProまたはP : プロリン

AsnまたはN : アスパラギン

GlnまたはQ : グルタミン

【0033】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1 グリア細胞に対する増殖促進活性の測定

ラット胎児脳より調製したグリア初代培養細胞を非働化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に $3 \times 10^4$ 個/mlとなるように浮遊させた。その細胞浮遊液100μlを96穴の平底マイクロプレート(A/N Nunc社製、Roskilde、デンマーク)の各ウエルに入れ2~3日間の培養後、各ウエルより75μlの培地を廃棄し、各ウエルに血清を含まないDMEM培地175μlを添加した。さらに2~3日間培養した後、各ウエルより20μlの培地を廃棄した。その後非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したテストサンプルの20μlを各ウエルに添加後、一晚培養した。翌朝、各ウエルに1μCiのトリチウムチミジン(5Ci/mmol、1mCi/ml、RCC Amersham)を添加後、さらに5~7時間培養した。培養後、各ウエルの培地を廃棄後、各ウエルに100μlの0.5%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡でグリア細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテックセルハーベスター(Flow Laboratories社製、Virginia, U.S.A.)を用いてガラスファイバーフィルター(大日本製薬株式会社製)上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0034】実施例1

①グリオーマ細胞NMC-G1の培養上清の採取

ヒトグリオーマ細胞NMC-G1を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中でコーニングローラーボトルを用い回転させながら37℃で培養した(0.2回/分)。コーニングローラーボトル表面上にNMC-G1

細胞がコンフルエントの状態になった後、培地を0.5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に変更した。3~4日おきに細胞培養上清を採取し、培地を新しい0.5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に変更した。採取した細胞培養上清を遠心し（ベックマン社製、モデルJ-6B、4000回転/分、15分間）、遠心上清を得、精製の出発材料とした。

#### 【0035】②GAFの精製

ステップ1：ヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー

①に記した方法で得たNMC-G1細胞の培養上清18リットルに5M NaCl水溶液を1/50容量（360ml）、10%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を1/1000容量（18ml）添加した。このように調製したNMC-G1細胞培養上清を、あらかじめ0.2M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で平衡化したヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラム（ベッド容積は80ml、Pharmacia LKB Biotechnology社製、Uppsala, Sweden）にペリスタリックポンプを用いて通す（流速150ml/時間、4℃）。レジンを450mlの0.2M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で洗浄した後（流速150ml/時間、4℃）、吸着したたんぱく質を400mlの2M NaClを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で溶出した（60ml/時間、8ml/フラクション、4℃）（図1）。溶出した各フラクションについてグリア細胞に対する増殖促進活性を参考例1に記載の方法で測定し、活性を示した画分（フラクション11からフラクション23）を集めた。

#### 【0036】ステップ2：濃縮

合計32リットルの培養上清についてステップ1のヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィー（ステップ1）を行ない活性画分をプールした（192ml）。この溶液をDiaflow YM-10メンブレン（分画分子量：10,000、Amicon Corp社製、Massachusetts, U. S. A.）で窒素ガス加圧下約35mlにまで濃縮した（4℃）。

#### 【0037】

ステップ3：ゲルろ過カラムクロマトグラフィー  
ステップ2で濃縮した溶液約35mlをセファクリルS-200HR（ベッド容積は1787ml、内径5cm×長さ91cm、Pharmacia LKB Biotechnology）にのせ、0.5M NaClと0.1%CHAPSを含む20mMトリス塩酸緩衝液で溶出・分画した（85ml/時間、10ml/フラクション、4℃）（図2）。各分画についてグリア細胞に対する増殖促進活性を参考例1に記載の方法で測定し、活性を示した画分（フラクション105からフラクション117）をプールした。さらに55リットルのNMC-G1培養上清について、ステップ1、2、3の各ステップを2回に分けて行なった。

【0038】ステップ4：ヘパリンアフィニティーカ-

ラムクロマトグラフィー

3回のゲルろ過カラムクロマトグラフィーでの活性画分をプールした（390ml）。プールした溶液に99mlの100%グリセリン、2.61mlの10%CHAPS水溶液、5.22mlの1Mトリス塩酸緩衝液（pH7.6）と154mlの水を添加した（合計651ml）。これをあらかじめ0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で平衡化したヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラム（ベッド容積は5.8ml）に通した（25ml/時間、4℃）。カラムを80mlの0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で洗浄した後（25ml/時間、4℃）、吸着したたんぱく質をNaClの濃度を直線的に上昇させることにより溶出し、分画した。塩濃度勾配は0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）50mlに、1.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）50mlを加えていくことにより作製した（25ml/時間、2ml/フラクション、4℃）（図3）。

【0039】ステップ5：ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ4でのグリア細胞に対して増殖促進作用を示す活性画分（フラクションNo. 23-30）をプールした16mlに、32mlの0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）を添加した。この48mlの溶液のうち46mlを、HR-894カラム（径8mm×長さ50mm、昭和電工、日本）を装置した高速液体クロマトグラフィー（Varian model 5040 system, Varian Associates社製、California, U. S. A.）にかけた。レジンに吸着したたんぱく質は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、流速1ml/分で溶出し、分画（1ml/フラクション）した。用いた緩衝液はAが0.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）で、Bが2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.6）である。溶出のプログラムは次に記すとおりで行なった。すなわち0分（100%A）-10分（90%A+10%B）-15分（90%A+10%B）-50分（65%A+35%B）-60分（100%B）-64分（100%B）-65分（100%A）として行なった（図4）。カラム温度は室温であった。

#### 【0040】

ステップ6：逆相高速液体カラムクロマトグラフィー  
ステップ5で得られた活性画分（フラクションNo. 32-38）をプールした7mlに、1.75mlの0.5M

リン酸緩衝液 (pH 6.0) を添加した。この 8.75 ml の溶液のうちの 8 ml を、Vydac C4 カラム (径 0.46 cm × 長 25 cm, Vydac, California, U. S. A.) を装置した高速液体クロマトグラフィー (Varian model 5040 System) にかけた。吸着したたんぱく質はアセトニトリルの濃度を直線的に上昇させることにより流速 0.8 ml/分 で溶出・分画 (0.8 ml/フラクション) した。用いた溶媒は A が 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) - 99.9% 水、B が 0.1% TFA - 90% アセトニトリルとした。溶出のプログラムは次に記すとおりで行った。すなわち 0 分 (100% A) - 15 分 (65% A + 35% B) - 110 分 (50% A + 50% B) - 112 分 (100% B) - 117 分 (100% B) - 120 分 (100% A) として行った (図 5)。カラム温度は室温であった。分取後、スピードバ

ックコンセントレーター (モデル A290、サーバント社製、米国) でアセトニトリルを除去した後、蒸留水を添加してすべての画分を 0.5 ml の液量に調製した。活性画分 (フラクション 55、59、60、61、62) を 2-メルカプトエタノール存在下 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色した結果を図 6 に示す。各画分は各々 25 kDa (フラクション 55)、29 kDa (フラクション 59、60)、30 kDa (フラクション 61、62) の単一なバンドを与えた。

#### 【0041】③ 精製の要約

NMC-G1 培養上清 33 リットルを用いての精製の要約を表 1 に記す。

#### 【0042】

【表 1】

サンプル	全たんぱく量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)	精製倍数
ヘパリン 2 モル 食塩溶出液	221	$177 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$	100	1
濃縮 (YM-10)	217	$216 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	122	1.3
セファクリル S-200HR	17.3	$126 \times 10^3$	$7.3 \times 10^3$	71	9.1
ヘパリンカラム (2 回目) 2.12		$60.6 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4$	34	36
ヘパリン HPLC	0.453	$34.5 \times 10^3$	$7.6 \times 10^4$	20	95
逆相 HPLC 分子量 25,000 0.0003 *		$1.84 \times 10^3$	$6.1 \times 10^6$	1.1	7,600
分子量 29,000 0.0002 *		$1.26 \times 10^3$	$6.3 \times 10^6$	0.7	7,900
分子量 30,000 0.0011 *		$4.85 \times 10^3$	$4.4 \times 10^6$	2.8	5,500

【0043】生物活性の測定は、参考例 1 に記載した方法で行なった。生物活性の単位はトリチウムチミジンの 50% 取り込み値を示すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンの 100% 取り込み値は、10% ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量は 280 nm における吸光度 1.0 が 1 mg/ml の蛋白濃度であるとして換算した。\*印の蛋白質量は銀染色による標準蛋白の染色強度を基に決定した。

#### 【0044】

実施例 2 GAF の各種培養細胞に対する作用 (1)

##### ① グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例 1-② に記載した方法で得られた精製本因子は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している (図 7)。図中横軸は GAF 濃度を示す。なおグリア細胞に対する

増殖促進活性の測定方法については、参考例 1 に記載した方法に従って行なった。精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、再度グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図 8 に示す。図中横軸は GAF 濃度を示す。図 7 と図 8 の結果において、50% トリチウムチミジン取り込み値を与える GAF 濃度に差が生じたのは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図 7 は精製後 -80℃ で保存後の標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作により GAF 蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

##### 【0045】(2) グリア細胞増殖促進活性②

GAF を添加した後のグリア細胞数の変化を調べた。以

下に記載した方法に従って行った。非働化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に $3 \times 10^4$ 個/mlとなるように浮遊させ、その500 $\mu$ lを24穴の培養プレート(Linbro社製、米国)の各ウエルに入れ、3日間培養した。その後各ウエルより440 $\mu$ lの培地を廃棄し、新たに340 $\mu$ lのDMEMを添加した。次に実施例1-②ステップ4に記載したヘパリンアフィニティークラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で50倍に希釈した溶液を50 $\mu$ l、またヘパリンを同じ溶液で500 $\mu$ g/mlとなるように溶解した溶液50 $\mu$ lを添加したウエル、どちらか片方のみを添加したウエル、また対照群として両方を添加しないウエルを作った。全てのウエルは、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で最終容積が500 $\mu$ lとなるようにした後、さらに2日間培養した。培養後、各ウエルを3mlのDMEMで2度洗浄し、0.5mlの0.2%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し細胞を浮遊させ、各ウエルの細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算定した。結果を図9に示す。グリア細胞数はGAFを添加することにより無添加群に比べ1.6倍に増加した。しかしヘパリンを添加したことによる効果はなかった。

【0046】(3) グリア細胞増殖促進活性の経時変化 GAFのグリア細胞増殖促進活性の経時変化を、以下に記すこと以外は参考例1に記載した方法に従って調べた。すなわち、実施例1-②のステップ5に記載したヘパリンアフィニティークラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で800倍に希釈したサンプル20 $\mu$ lをウエルに添加後、4, 8, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31および40時間後に、各ウエルにそれぞれ1 $\mu$ Ciのトリチウムチミジンを添加した。3時間後にハーベストし、細胞に取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。結果を図10に示すが、GAF添加後16から19時間後にトリチウムチミジンの取り込みがピークになった。

【0047】(4) 線維芽細胞に対する増殖促進活性 実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対し増殖促進活性を有していた(図11)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A31に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行なった。マウスBALB/3T3 clone A31細胞を5%牛牛血清を含むDMEM培地でヌンク96穴マイクロタイタープレート(平底)に1穴あたり $2 \times 10^3$ 個を75 $\mu$ lの培地にて播種して、培養し、翌日、各ウエルより50 $\mu$ lの培地を廃棄し、各ウエルに血清を含まないDMEM培地を175 $\mu$ l添加した。3~4日間

培養したのち各ウエルより20 $\mu$ lの培地を廃棄した。その後、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したテストサンプルの20 $\mu$ lを各ウエルに添加後一晩培養した。翌朝、各ウエルに1 $\mu$ Ciのトリチウムチミジン(5Ci/mmol, 1mCi/ml RCC Amersham)を添加後、さらに5~7時間培養した。培養後各ウエルを約1mlのPBSで洗浄し、100 $\mu$ lの5%SDS水溶液を添加し、37℃で一晩放置した。各ウエルの細胞抽出液をチューブに集め、細胞に取り込まれた $^3$ H-Tdr量をシンチレーションカウンターにて測定した。さらに、精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、5Ci/mmol, 1mCi/mlのトリチウムチミジン溶液を用いて再度線維芽細胞A31に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図12に示す。図中横軸はGAF濃度を示す。図11と図12の結果において、50%トリチウムチミジン取り込み値を与えるGAF濃度に差が生じたのは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図11は精製後-80℃で保存後の標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作によりGAF蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0048】

(5) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用 実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対し増殖促進活性を有していなかった(図13)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性は以下に記載する方法に従って行なった。本検定に用いられた細胞は、ヒトさい帯より単離された静脈血管内皮細胞(以下HUV E細胞)である。また、細胞増殖度の測定には以下に述べるMTTアッセイ法を用いた。MTTアッセイの手法は多田らの方法[ジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッド(J. Immunol. Methods), 93, 157 (1986)]に若干の変更を加えた。即ち、継代維持されているHUV E細胞を0.002%EDTA(ドータイト社345-01882)を含む0.125%トリプシン酵素溶液(ペーリンガーマンハイム社)を用いて単一細胞に解離し、得られた細胞を牛胎児血清(ウイタカーバイオプロダクト社)を2.5%含む、GIT培地(日本製薬398-00515)からなるHUV E細胞培地に懸濁した。この細胞懸濁液に含まれる細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社 ZM型)を用いて算出し、以下の培養に供した。 $2 \times 10^3$ 個のHUV E細胞を含む100 $\mu$ lのHUV E細胞懸濁液を、96穴培養皿(ヌンク社 F96)に加え、37℃で培養した(日立炭酸ガス-窒素ガス制御培養機CH-16型、CO<sub>2</sub>: 5%、O<sub>2</sub>: 7%)。培養翌日に、各々のサンプルをHUV E細胞培地に加えた。さらにヘパリン(シグマ社)を終濃度5.0 $\mu$ g/mlないし20 $\mu$ g/mlに

なるように添加したものである。各サンプルを加えたのち、さらに培養を3日間行ない、培養皿より培地を除き、1.0 mg/mlのMTT試薬（ドータイト社 34101823）を含むHUVE培地を100 µl加え、37℃で4時間保温した。その後、10% SDS水溶液（和光純薬 191-07145）を100 µl加え、4時間保温を続けた。反応終了の後、反応液を含む96穴培養皿を振盪し、反応液の波長590 nmにおける吸収を、マイクロタイタープレート吸光度測定機（タイターテック MCC 341）を用いて測定した。

#### 【0049】（6）ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対する作用

実施例1-②に記載した方法で得られた精製本因子は、ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対し増殖促進活性を有していた（図14）。図中横軸はGAF濃度を示す。なおPC-12に対する増殖促進活性の測定は以下に記載する方法で行なった。GAFを非働化したウマ血清を1%含むRPMI-1640培地で適当に希釈し、その50 µlを96穴マイクロプレートに入れた。次にPC-12細胞を非働化したウマ血清を1%含むRPMI-1640培地に10<sup>6</sup>個/mlになるように浮遊させ、その細胞浮遊液50 µlを96穴の平底マイクロプレート（A/N Nunc社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルに0.5 µCiのトリチウムチミジン（5 Ci/mmol, 1 mCi/ml RCC Amersham）を添加後、さらに5時間培養した。培養後細胞をTiter tekセルハーベスターを用いてガラスファイバーフィルター上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

#### 【0050】（7）活性の安定性

ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bの2M NaCl溶出画分（実施例1②ステップ1）を、100℃で5分熱処理すると活性は完全になくなった。また室温でpH2、30分処理すると部分的に活性を失った（図15）。図中横軸はGAFの希釈倍数を示している。

#### （8）抗原性：酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）とグリア活性化因子間の免疫学的交差性

実施例1-②に記載の方法により精製した標品について、抗aFGFウサギポリクローナル抗血清と抗bFGFウサギIgGを用いてウエスタンブロッティングを行なった（図16）。図16から判るように本因子はaFGFとbFGFそれぞれとの間に免疫学的交差性を示さなかった。

#### 【0051】実施例3

NMC-G1細胞が産生するGAF蛋白成分の性質  
実施例1で得られた25 kDa GAF 30 µg、29

kDa GAF 30 µgおよび30 kDa GAF 60 µgをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ProBlott膜（Applied Biosystem社製、カリフォルニア、米国）上に乾式ブロッティング装置（ATTO社製、東京）を用いて蛋白をトランスファーした。メンブレンを2% PVP-360溶液（2% ポリビニルピロリゾン-360）（シグマ社製、米国）を含むリン酸緩衝液-食塩（8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を1リットルの水に溶かしpH7.4としたもの）に45分間振とうしつつ浸した後、メンブレンをビオチニル化コンカナバリンA（Vector Lab社製、米国）を10 µg/mlの濃度で含む2% PVP-360溶液に移し、1時間振とうした。その後メンブレンをTNT緩衝液（0.5M NaClと0.1% Triton X-100を含む25 mM トリス塩緩衝液（pH7.5））で洗浄した（10分間、3回）。さらに、メンブレンをアビディンとビオチニル化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合物（Standard Vectastain（登録商標）ABCキット、Vector Lab社製）を含むリン酸緩衝液-食塩溶液に45分間振とうしつつ浸した後、TNT緩衝液で洗浄した（10分間、3回）。12 mg 4-クロロ-1-ナフトールと4 ml メタノールを混ぜたものに20 ml TN緩衝液（0.5M NaClを含む25 mM トリス塩緩衝液（pH7.5））と13.2 µl 過酸化水素水を混ぜたものを加え、それにメンブレンを浸し、発色させた。図17にその結果を示す。N-グリカナーゼを用いる酵素的脱グリコシル化は、Genzyme社（ボストン、米国）のプロトコールに従って実施した。GAFをN-グリカナーゼ処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを銀染色した結果を図18に示す。25 kDa、29 kDaおよび30 kDaのGAFは部分的ではあるが、各々その分子量が3から4 kDaだけ減少した。以上、二つの実験より、25 kDa、29 kDaおよび30 kDa GAFにN-グリコシド型糖鎖が付加していることが確認された。

#### 【0052】実施例4

##### N末端アミノ酸配列の分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元条件下）で単一の3種類のGAF（25 kDa、29 kDaおよび30 kDa）を、ポリビニルデンダイフルオライドタイプのメンブレンであるProBlott（登録商標）（Applied Biosystems社製、カリフォルニア、米国）に吸着させ、プロテインシーケンサー（モデル473Aシステム、Applied Biosystems社製）を用いて、アミノ酸配列の解析を行なった。用いた蛋白量は、25 kDa GAFが60 pmol、29 kDa GAFが5 pmol、30 kDa GAFが55 pmolであった。得られた配列の結果を以下に記す。

1 5 10 15 16  
 25 k D a Ala-Asp-Z<sub>1</sub>-Leu-Gly-Gln-Ser-Glu-Ala-Gly-Gly-Leu-Pro-X-Gly-Pro-  
 20 21  
 Ala-Val-Thr-Asp-Leu- (配列番号: 3)  
 1 5 6 7 10 13  
 29 k D a X-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-Asn-Val-Pro-(Ser)-Leu- (配列番  
 号: 4)  
 1 5 10 15 16  
 30 k D a Z<sub>2</sub>-Gly-Glu-Val-Gly-Asn-Tyr-Phe-Gly-Val-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe  
 20 23  
 -Gly-Asn-Val-(Pro)-X-Leu-Leu- (配列番号: 5)

Z<sub>1</sub>=HisまたはProを示す。

Z<sub>2</sub>=LeuまたはAlaを示す。

X: 未同定のアミノ酸

( ): 確定できなかったが推定されたアミノ酸

最初のステップのアミノ酸 (N末端アミノ酸) および10番目を超えるアミノ酸については確実性に乏しい。

#### 【0053】実施例5

GAF cDNAのクローニングとその塩基配列の解析  
 実施例3で得られた30 kDa GAFのアミノ酸配列を  
 もとに、この配列に対応し、かつ制限酵素の認識配列を  
 付加した下記のオリゴヌクレオチドプライマー2本 (p  
 rimer 1, 2) を合成した。

1 5 10  
 30 k D a GAF Z<sub>2</sub> Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val-  
 primer 1: 5' -AAGGATCCGTIGGIAAYTAYTTYGG-3' (配列番号: 6)

11 15 20 23  
 Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val (Pro) X Leu Leu  
 Primer 2: 5' -AGAATTCACRTTICRAAIGGIAC-3' (配列番号: 7)  
 Z<sub>2</sub>=Leu または Ala を示す。 I: Inosine Y=T/C, R=A/G

このプライマーを用いてヒトゲノム由来DNAをテンプレートとしてPCR (polymerase chain reaction) 反応 (Mullis, K, BとFuloora, F. A. メソッズ イン エンザイモロジ (Academic press) 155巻、335頁、1987) を行った。(GeneAmp (登録商標) DNA Amplification Reagent K' t (シータス社、米国) ゲノムDNA 1μgに対して、プライマー1, 2をそれぞれ560ng加え、100μlの反応液中Ampli Taq (登録商標) (シータス社、米国) 2.5ユニットを添加して94℃1分、50℃2分、72℃3分のDNA合成サイクルを25回くり返した。この反応物について、アクリルアミドゲル電気泳動を行い予期される長さ (63bp) の断片を回収し、その塩基配列を解析したところ、下記の配列が得られた。

5' -GGATCCGTGGGGAACCTATTTTCG  
 GGGTGCAGGATGCGGTCCCCTTCGG  
 CAACGTGAATTTC-3' (配列番号: 8)

この配列をもとにして再度、下記のプローブ2本 (probe 1, 2) を化学合成した。

probe 1 5' -TGGGGAACCTATTTTCG  
 GGGTGCAGGATGCGG-3' (配列番号:  
 9)

probe 2 5' -ACGTTGCCGAAGGGG  
 ACCGCATCCTGCACC-3' (配列番号: 1

0)

一方ヒト包皮由来初代培養細胞mRNAより合成したcDNAをpCDベクター (Okayamaら、モレキュラー・セル・バイオロジー (Molecular Cell Biology), 3, 280 (1983) 参照) に組み込んで作成した大腸菌x1776を宿主としたcDNAライブラリーをNational Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, U. S. A. の岡山博士より分与を受けた。このcDNAライブラリーよりアルカリ法 (Birnbom, H. C. & Doly, J. ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 1, 1513 (1979)) でプラスミドDNAを抽出し、このDNAを大腸菌DH1に感染させ、約2×10<sup>5</sup> 個のcloneよりなる大腸菌DH1を宿主としたcDNAライブラリーを作成した。

【0054】上記大腸菌DH1を用いたcDNAライブラリーをニトロセルロースフィルター (ミリポア社、HATFフィルター) 上に約1×10<sup>5</sup> clone/フィルターとなるように10枚まき、このフィルターをマスターフィルターとしている各2枚ずつを1組としたレプリカフィルター計20枚を作成した。このレプリカフィルター上の大腸菌を0.5N NaOH溶液で溶かし、露出変性したプラスミドDNAをフィルター上に固定した (Crunstein, M. & Hogness,



D. S., Proc Natl Acad. Sci. USA 72, 8961 (1975)】。

【0055】前記化学合成したprobe 1, 2についてT4ポリヌクレオチドキナーゼと $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATPとにより、5'末端に $^{32}\text{P}$ を導入し、これらをプローブとして別々にDNAを固定したレプリカフィルターに会合させた。会合反応は、 $10\mu\text{Ci}$ のプローブを含む $5\times\text{SSPE}$  [ $180\text{mM NaCl}$ 、 $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $1\text{mM EDTA}$  (pH7.4)]、 $5\times\text{Denhardt's}$ 、 $0.1\%$  SDS、 $100\mu\text{g/ml}$ 変性サケ精子DNA溶液 $10\text{ml}$ 中で、 $55^\circ\text{C}$  16時間行い、反応後フィルターを $5\times\text{SSC}$  [ $0.15\text{M NaCl}$ 、 $0.015\text{M Sodium citrate}$ ]  $0.1\%$  SDS溶液で室温で3回さらに $60^\circ\text{C}$  30分ずつ2回洗浄した[T. maniatistら、“Molecular Cloning” Cold Spring Harbor Laboratory, P. 309 (1982)]。

【0056】洗浄したフィルターよりラジオオートグラムをとり、二種類のプローブの両方に対して反応する菌株を一組2枚のレプリカフィルターのラジオオートグラムを重ね合わせるにより探した。この方法により $1\times 10^6$ クローンより二種類のプローブに対して反応する2株を得た。これら2株よりプラスミドDNAをアルカリ法(前出)によって抽出精製した。プラスミドDNA中のcDNA部分を制限酵素BamHIにより切り出し、アガロースゲル電気泳動で分画すると、2株由来のcDNAはいずれも約1.55Kbの同鎖長を示した。従って、この2株は同じものであると考えられた。この2株の一方の菌株(Escherichia coli DH-1/pGAF1)に含まれるプラスミド中のcDNA部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法(J. Messingら、ヌクレック・アシッツ・リサーチ, 9, 309 (1981))によって決定した。その塩基配列(配列番号: 2)および塩基配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号: 1)を図19に示した。pGAF1に含まれるcDNA部分は1493bpであり、5'側非翻訳領域、全アミノ酸コード領域、3'側非翻訳領域及びpolyA鎖を含んでいた。コードされていたアミノ酸配列は208アミノ酸であり、この配列中にN末端配列分析(実施例4)により明らかにされた30kDa、29kDa、25kDaの部分アミノ酸配列はすべて含まれていた。一部(25kDaの1位のAla、29kDaの12位のSer、30kDaの23位のLeu)、蛋白のアミノ酸分析(実施例4)で得られた配列と相異なるアミノ酸配列がコードされているが、相異点はいずれもアミノ酸配列分析で不確実な結果を与えやすいN末端、あるいは10残基を超えて同定された部分であり、cDNAより推定された配列の方が正しいものと考えられる。

#### 【0057】実施例6 GAFをコードする遺伝子の動物細胞における発現:

(1) GAFのCOS-7細胞での発現  
サルCOS-7細胞を10%NU-Serum (Collaborative Research社)を含むIMDM培地でファルコン径60mmプラスチックディッシュに1枚当たり $6\times 10^5$ 個播種した。翌日無血清のIMDM培地で洗浄後、公知の方法[B. Seedら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52:3365 (1987)]に従い、プラスミドpGAF1のDNA  $2\mu\text{g}$ 及び $10\mu\text{g}$ と $400\mu\text{g/ml}$ のDEAE-dextranとを含む反応溶液を調製し細胞に添加した。 $37^\circ\text{C}$ で4時間インキュベーションした後に2分間DMSO処理を行った。その後10%NU-Serumを含む培地(3ml/ディッシュ)で培養を続け、70~72時間後に産生されたGAFを含む培地を集めた。さらにディッシュあたり1.5mlのリン酸緩衝生理食液水中に細胞を回収した。pGAF1をトランスフェクトしたCOS7細胞の培養上清中にグリア細胞増殖促進活性が検出された。GAF cDNAが含まれていないベクターだけのプラスミドpCDXをトランスフェクトしたCOS-7細胞、またトランスフェクトしない細胞の培養上清中には活性は検出されなかった(図20)。凍結融解を2度および超音波処理をして得られた細胞抽出液中にはコントロールと比べて有意な活性がなかった。この結果からpGAF1のcDNAがGAFをコードしていることが確認されるとともに、COS細胞でcDNAを発現させると産物は培養液中へ分泌されることが明らかとなった。

#### 【0058】(2) GAFのCHO細胞での発現

(a) 発現用プラスミドpDGAF1の構築  
前記実施例5で得られたGAFの全構造を含むプラスミドpGAF1を制限酵素BamHIで切断し、1.55kbのDNA断片を単離した。一方、動物細胞用ベクターpTB399 [セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション (Cell Struct. Funct. 12:205 (1987))]を制限酵素BamHIで切断しIL-2 cDNA領域を除去した後、前記のGAF cDNA 1.55kb断片を挿入して、Abelson マウス白血病ウイルス(MuLV)LTRの支配下に動物細胞でGAF cDNAを発現させ得る発現用プラスミドpRGB12を構築した。さらに、これを制限酵素SalI-HindIIIで切断して発現ユニット部分(プロモーター遺伝子-ポリ(A)シグナル)をハムスタージヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)発現用プラスミドpTB348 [セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション (Cell Struct. Funct. 12:205 (1987))]のSV40プロモーター上流にあるSalI-HindIII部位に挿入して、プラスミドpDGAF1を構築した。プラスミドpDGAF1の構築図を図21に示す。

# 【0059】 (b) CHO細胞における発現

CHO dhfr<sup>+</sup>細胞を10%牛胎児血清を含むHam F12培地で直径6 cmの組織培養用ディッシュに播種し、翌日、同培地で培地交換した。2時間後にリン酸カルシウム法 (Graham ら、Virology (Virology) 52, 456 (1973))によりプラスミドpDGAF1 DNA 10  $\mu$ gをトランスフェクトした。2日間、増殖培地で培養した後、細胞を35  $\mu$ g/mlプロリンと10%透析FCSを含むDMEM培地で96穴マイクロプレート (Nunc社)にまき直し、3~4日毎の培地交換を行い、いくつかのdhfr<sup>+</sup>形質転換体を選択した。これらを35  $\mu$ g/mlプロリンと5%FCSを含むDMEM培地で24穴マイクロプレート (Linbro, Flow社)に移し、各クローンを培養した。以後、用いた培地は35  $\mu$ g/mlプロリンと5%FCSを含むDMEM培地である。これらのクローンのうちGAFたん白を産生している16クローンを6 cmの組織培養用ディッシュに移し、メトトレキセート (MTX) 濃度を3段階 (0, 1, 1, 10  $\mu$ M) に上げながら、10  $\mu$ M MTX耐性株を取得しGAF遺伝子の増幅をはかる。各クローンの培養上清中に含まれるGAF活性を図22に示す。図中、横軸は添加した培養上清の希釈率を示している。GAF活性の高いクローンを選択し、糖鎖の付加した天然型GAF産生細胞として確立し、GAFの採取等に用いる。

# 【0060】 実施例7 GAF遺伝子導入によるマウス

表2 GAF遺伝子導入によるA31細胞のフォーカス形成

プラスミド	トランスフェクトしたDNA量 ( $\mu$ g)				
	0	1	2	5	10
pTB1055	0*	N. T.	0	N. T.	0
pRGB12	0	3	28	25	33

\*: ディッシュ当りのフォーカス数

N. T.: 未検出

## 実施例8

### (1) GAFの大腸菌での発現

(a) GAF発現用プラスミドpETGAF1の構築  
前記実施例5で得られたGAFの全構造遺伝子を含むプラスミドpGAF1を制限酵素KpnI-BamHIで切断し、1.25 kbのcDNA断片を単離した。一方、T7プロモーターを含むプラスミドpET3-cを制限酵素NdeI-BamHIで切断し、4.6 kbのDNAを単離し、そこに前記のGAF cDNA 1.25 kb断片と、精製GAFタンパクN末端のLeuの前にMetが来る様に合成したDNA断片 (NdeI-KpnI) ([配列番号11] および [配列番号12]) を挿入して、T7プロモーターの支配下に、GAF cDNAを発現させ得る発現用プラスミドpETGAF1を構築した。プラスミドpETGAF1の構築図を図23に示す。このプラスミドを用いて大腸菌MM294

# BALB/c 3T3細胞の形質転換

(1) GAF発現用プラスミドpRGB12の構築  
実施例6に記載したプラスミドpRGB12をGAF発現用プラスミドとした。コントロールのプラスミドとしては、GAF cDNAインサートのないプラスミドpTB1055を用いた。

## (2) BALB/c 3T3細胞の形質転換

マウスBALB/3T3 clone A31 (サブクローンA31-1-1 (Kakunaga ら、サイエンス (Science) 209, 505 (1980) )、Dr. K. Kakunaga より分与を受けた)を10%牛血清を含むDMEM培地で直径6 cmの組織培養用ディッシュに1 $\times$ 10<sup>5</sup>個播種し、翌日、同培地で培地交換した。3時間後にリン酸カルシウム法 (Graham ら、Virology (Virology) 52, 456 (1973))によりプラスミドpRGB12あるいはpTB1055を1, 2, 5および10  $\mu$ g、それぞれトランスフェクトした。37℃で4時間インキュベートした後、15%グリセロールを含むPBS溶液で3分間刺激した。5%牛血清を含むDMEM培地で3~4日毎に半量ずつ培地交換を行いながら4週間培養を続けた。培養終了後、培地を捨て、氷冷メタノールを加え15分間細胞を固定した。水洗後、ギムザ溶液で20分間染色した。ディッシュを水洗、風乾後、染色されたフォーカスを数えた。その結果を表2に示す。GAF遺伝子には、はっきりとした形質転換性があることがわかった。

# 【0061】

(DE3)/pLysSを形質転換することにより、GAFを発現する形質転換体E. coli MM294 (DE3)/pLysS, pETGAF1を得た。得られたMM294 (DE3)/pLysS, pETGAF1をLB培地で培養し、イソプロピル- $\beta$ -D(-)-チオガラクトシド (和光純薬 (株)、日本) で発現を誘導した後、培養液200  $\mu$ l 相当の菌体全抽出蛋白質をGAF蛋白のN末端部分を認識するウサギ抗GAFポリクローナル抗血清 (500倍希釈) を用いウェスタンブロッティング法により調べると、特異的なバンドが確認された (図24)。GAF cDNAの含まれないプラスミドpET3-cによる形質転換体MM294 (DE3)/pLysS, pET3-cではこのバンドは産生されない。

【0062】 (2) 大腸菌で産生させたヒトGAF (rhGAF) の抽出  
E. coli MM294 (DE3)/pLysS, pETGAF1を50  $\mu$ g/mlのアンプシリンおよび10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLBメディア  
ム中にて $37^{\circ}\text{C}$ で振とう培養した。培養液のKlett  
値が120に達した時点でイソプロピルー $\beta$ -D(-)  
-チオガラクトシドを最終濃度0.4mMになるように  
添加し、さらに $37^{\circ}\text{C}$ にて3.5時間振とう培養した。  
1リットルの培養液より、遠心(6,000回転/分、  
10分間)により集めた菌体を、氷上にて、80mlの  
2mM(p-アミジノフェニル)メタンスルホン酸  
フルオリドハイドロフルオリド(和光純薬(株)、  
日本)、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の卵白リゾチーム(生化学工  
業株式会社、東京)、および0.1M食塩を含む20m  
Mトリス塩緩衝液で懸濁させ $4^{\circ}\text{C}$ にて1時間置いた後、  
 $37^{\circ}\text{C}$ で3分間インキュベートした。その懸濁液を、氷  
で冷却して超音波処理(BRANSON社製、SONIFIER(登録  
商標)、米国、CELL DISRUPTOR 200 出力8にて2分  
間)した。大腸菌抽出物を17,000回転/分、40分間の  
遠心により得た。

【0063】(3)大腸菌が産生するrhGAF(rh  
GAF)の精製

ステップ1: 硫酸沈殿

1リットルの培養液より得られた80mlの大腸菌抽出  
物に27mlの飽和硫酸アンモニウム水溶液を添加混合  
後、 $4^{\circ}\text{C}$ にて1昼夜放置した。その後17000回転/  
分、40分間の遠心にて上清を得た。

ステップ2: 疎水カラムクロマトグラフィー

ステップ1で得られた100mlの遠心上清を、あらか  
じめ25%飽和硫酸を含む20mMトリス塩酸緩衝液  
(pH7.6)で平衡化したButyl-Toyopearl 650 M  
(ベッド容積50ml、内径2.5cm×長さ10c  
m、東ソー株式会社製、東京)に通した(80ml/時  
間、 $4^{\circ}\text{C}$ )。12.5%飽和硫酸と2mM aPMSF  
を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で充分  
担体を洗浄後、15%グリセリン、0.1%CHAPS  
および2mM aPMSFを含む20mMトリス塩酸緩  
衝液(pH7.6)でrhGAF蛋白を含む画分を得た

(80ml/時間、10ml/フラクション、 $4^{\circ}\text{C}$ )

(図25)。

ステップ3: ヘパリンアフィニティー高速液体カラム  
クロマトグラフィー

ステップ2でのrhGAF蛋白を含む画分(フラクショ  
ン44から47)をプールした(40ml)。この40  
mlの溶液のうち36mlを、HR-894(内径8m  
m×長さ50mm、昭和電工、日本)を装置した高速液  
体クロマトグラフィー(Gilson Medical Electronics社  
製、フランス)にかけた。レジンに吸着したたんぱく質  
は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、  
流速2ml/分で溶出し分画(2ml/フラクション)  
した。用いた緩衝液はAが0.4M NaCl、0.1  
%CHAPSと15%グリセリンを含む10mMトリス  
塩酸緩衝液(pH7.6)で、Bが2M NaCl、  
0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む10mM  
トリス塩酸緩衝液(pH7.6)である。溶出のプロ  
グラムは次に記すとおりで行った。すなわち0分(100  
%A)-70分(75%A+25%B)-75分(100  
%B)-80分(100%B)-85分(100%  
A)として行った(図26)。カラム温度は室温であつた。

【0064】蛋白の溶出画分の1 $\mu\text{l}$ を2-メルカプト  
エタノール存在下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳  
動し(ゲル濃度12.5%)、銀染色した結果を図27  
に示す。食塩濃度を上昇させることにより溶出されてき  
た画分は、27kDaの単一なバンドを与えた。またこ  
の27kDaたん白はN末部分と結合するウサギ抗GAF  
ポリクローナル抗血清で認識された。(図28)。フ  
ラクション27から42をプールした。

【0065】(4)精製の要約

1リットルのE. coli MM294(DE3)/p  
Lys S, pETGAF1培養液から出発したrhGA  
Fの精製の要約を表3に記す。

表3

サンプル	全たん白量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/mg)	活性 回収率 (%)	精製 倍数
大腸菌抽出物	672	$4.16 \times 10^7$	$6.19 \times 10^4$	100	1
25%飽和硫酸上清	210	$4.35 \times 10^7$	$2.07 \times 10^5$	105	3.3
Butyl-Toyopearl	37.6	$4.10 \times 10^6$	$1.09 \times 10^5$	10	1.8
ヘパリンHPLC	4.5	$3.31 \times 10^6$	$7.35 \times 10^5$	8.0	12

生物活性は、参考例1に記載した方法で行った。生物活  
性の単位はトリチウムチミジンの50%取り込み値を示  
すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチ  
ミジンの100%取り込み値は、10%ウシ胎児血清に  
より誘導される値とした。蛋白質量はMicro BCA  
キット(PIERCE社製、米国)により、ウシ血清ア  
ルブミンを対照にして算定した。

【0066】

実施例9 因子の各種培養細胞に対する作用(2)

(1) グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(3)に記載した方法で得られたrhGAF  
は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している(図2  
9)。図中横軸はGAF濃度を示す。なおグリア細胞に  
対する増殖促進活性の測定方法については、参考例1に

記載した方法に従って行った。

#### (2) 線維芽細胞に対する増殖促進活性

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、線維芽細胞マウス B A L B / 3 T 3 c l o n e A 3 1 細胞に対し増殖促進活性を有していた (図 3 0) 。図中横軸は G A F 濃度を示す。なお線維芽細胞 A 3 1 に対する増殖促進活性の測定については、実施例 2-(4) で記載した方法に従って行った。

#### (3) ラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、ラット血管平滑筋細胞に対し増殖促進活性を有していた (図 3 1) 。図中横軸は G A F 濃度を示す。なおラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行った。ラット初代培養血管平滑筋細胞を 1 0 % 仔牛血清を含むイーグル MEM 培地でヌンク 9 6 穴マイクロタイタープレート (平底) に 1 穴あたり  $3 \times 10^3$  個を  $100 \mu\text{l}$  の培地にて播種して培養し、翌日、各ウェルより  $80 \mu\text{l}$  の培地を廃棄し各ウェルに血清を含まないイーグル MEM 培地を  $180 \mu\text{l}$  添加した。2 日間培養したのち各ウェルより  $20 \mu\text{l}$  の培地を廃棄した。その後、0.1 % ウシ血清アルブミンを含む DMEM 培地で適当に希釈したテストサンプルの  $20 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加後一晩培養した。翌朝、各ウェルに  $1 \mu\text{Ci}$  のトリチウムチミジン ( $5 \text{ Ci}/\text{mmol}$ 、 $1 \text{ mCi}/\text{ml}$  R C C A m e r s h a m) を添加後、さらに 5 時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに  $100 \mu\text{l}$  の 0.5 トリプシンと 0.01 % E D T A を含む P B S を添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡で細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテックセルハーベスター (Flow laboratones 社製、Virginia, USA) を用いてガラスファイバーフィルター (大日本製薬株式会社製) 上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミジンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0067】

#### (4) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例 8-(3) に記載した方法で得られた r h G A F は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対して増殖促進活性を有していなかった (図 3 2) 。図中横軸は G A F または b F G F のたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性の測定については、実施例 2-(5) に記載した方法に従って行った。

【0068】

#### (5) r h G A F の巨核球系コロニー刺激因子活性

B A L B / c メスマウス骨髄細胞は、20 % ウシ胎児血清 (F C S) 含有イスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M) に  $2 \times 10^7$  個/ $\text{ml}$  となるように懸濁し、F C S をコートしたプラスチック培養皿中で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間イ

配列:

ンキュベーションして付着性細胞を除去した。得られた非付着性骨髄細胞は、I M D M で 3 回洗浄した後実験に供した。細胞を 1 % Neutridoma SP (boehringer mannheim 社) 含有 I M D M に懸濁し、ヒトリコンビナント G A F (r h G A F) とともに  $1 \times 10^5$  個ずつ 9 6 穴平底プレートに播種した。r h G A F は 0.6 M N a C l, 15 % グリセリン, 0.1 % C H A P S, 10 m M T r i s - H C l (p H 7.6) に  $125 \mu\text{g}/\text{ml}$  溶解したものを I M D M で希釈して使用し、G A F を含まない緩衝液も同様に希釈して実験系に添加した。また、ポジティブコントロールとしてマウスリコンビナント I L - 3 (m r I L - 3) (Genzyme 社) を用いた。これを、 $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  を含む空気の下で 4 日間培養した。その後、 $5 \text{ mg}/\text{ml}$  M T T (SIGMA 社) 含有 P B S 溶液を  $20 \mu\text{l}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 5 時間培養した。10 % S D S, 0.01 N H C l 溶液を  $100 \mu\text{l}$  添加し、 $37^\circ\text{C}$  でさらに 1 晩インキュベートした後、 $590 \text{ nm}$  の吸光度を測定し、骨髄細胞の増殖を調べ、図 3 3 に示した。一方、同様に調製した細胞を  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  を含む空気の下で 7 日間培養した。5 % グルタルアルデヒド含有 P B S 溶液を  $50 \mu\text{l}$  添加して  $2000 \text{ rpm}$  で 5 分間遠心し、細胞を固定した。0.1 M リン酸緩衝液 (p H 6.0) で一度洗浄後、アセチルコリンエステラーゼ染色 (続生化学実験講座 8 血液上巻、149 頁参照) にて巨核球を染色し、ウェルあたりの巨核球数を倒立顕微鏡下で数え、図 3 4 に示した。これらの結果から、r h G A F にはマウス骨髄細胞を増殖させる活性があること、さらに骨髄細胞中の巨核芽球に作用してこの細胞を増殖分化させる活性があることが明らかとなった。

【0069】

【0070】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 208

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : アミノ酸 (amino acid)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : タンパク質 (protein)

ハイポセティカル配列 (HIPOTHTICAL) : N o

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : Homo sapiens

ハプロタイプ (HAPLO TYPE) : 2n

組織の種類 (TISSUE TYPE) : skin

細胞の種類 (CELL TYPE) : fibroblast

直接起源 (IMMEDIATE SOURCE) :

ライブラリー名 (LIBRARY) : Human foreskin cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAF1

Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala  
5 10 15  
Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu  
20 25 30  
Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
35 40 45  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
50 55 60  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
65 70 75 80  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
85 90 95  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
100 105 110  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
115 120 125  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
130 135 140  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
145 150 155 160  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
165 170 175  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
180 185 190  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser  
195 200 205

【0071】配列番号(SEQ ID NO) : 2

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 1493

配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数(STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL) : No

アンチセンス(ANTI-SENSE) : No

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n

組織の種類(TISSUE TYPE) : skin

細胞の種類(CELL TYPE) : fibroblast

直接起源(IMMEDIATE SOURCE) :

ライブラリー名(LIBRARY) : Human foreskin cDNA library

クローン名(CLONE) : pGAF1

配列:

TGAAACAGCA GATTACTTTT ATTTATGCAT TTAATGGATT GAAGAAAAGA ACCTTTTTTT 60  
TTCTCTCTCT CTCTGCAACT GCAGTAAGGG AGGGGAGTTG GATATACCTC GCCTAATATC 120  
TCCTGGGTTG ACACCATCAT TATTGTTTAT TCTTGTGCTC CAAAAGCCGA GTCCTCTGAT 180  
GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTTT CGGTGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA 240  
TGTGCCCGTG TTGCCGGTGG ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA 300  
AGCAGGGGGG CTCCCAGGG GACCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT 360  
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC 420  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC 480  
AGTGGGCCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA 540  
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTAGAG AACAGTTCGA 600  
AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG 660  
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAACGGCA 720  
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACTGTA 780  
TAAGGATATT CTAAGCCAAA GTTGACAAAG ACAATTCTT CACTTGAGCC CTAAAAAAG 840

TAACCACTAT AAAGGTTTCA CGCGGTGGGT TCTTATTGAT TCGCTGTGTC ATCACATCAG 900  
 CTCCACTGTT GCCAACTTTT GTCCCATGCA TAATGTATGA TGGAGGCTTG GATGGGAATA 960  
 TGCTGATTTT GTTCTGCACT TAAAGGCTTC TCCTCCTGGA GGGCTGCCTA GGGCCACTTG 1020  
 CTTGATTAT CATGAGAGAA GAGGAGAGAG AGAGAGACTG AGCGCTAGGA GTGTGTGTAT 1080  
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT ATGTGTGTAG CGGAGATGT GGGCGGAGCG 1140  
 AGAGCAAAAG GACTGCGGCC TGATGCATGC TGGAAAAAGA CACGCTTTTC ATTCTGATC 1200  
 AGTTGTACTT CATCCTATAT CAGCACAGCT GCCATACTTC GACTTATCAG GATTCTGGCT 1260  
 GGTGGCCTGC GCGAGGGTGC AGTCTTACTT AAAAGACTTT CAGTTAATTC TCACTGGTAT 1320  
 CATCGCAGTG AACTTAAAGC AAAGACCTCT TAGTAAAAAA TAAAAAATAA TAAAAATAA 1380  
 AAATAAAAAA AGTTAAATTT ATTTATAGAA ATTCCAAAAA AAAAAAATAA AAAAAATAA 1440  
 AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAA 1493。

【0072】配列番号(SEQ ID NO): 3 生物名(ORGANISM): Homo sapiens  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 21 ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n  
 配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid) 組織の種類(TISSUE TYPE): brain  
 鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single) 細胞の種類(CELL TYPE): glioma  
 トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear) セルライン(CELL LINE): NMC-G1  
 配列の種類 (MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein) 配列の特徴(FEATURE)  
 ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): No 特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E  
 アンチセンス(ANTI-SENCE): No 3 Xaa= His または Pro  
 フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment 14 Xaa= undetermined  
 起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Ala Asp Xaa Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Xaa Gly Pro  
 5 10 15  
 Ala Val Thr Asp Leu  
 20。

【0073】配列番号(SEQ ID NO): 4 生物名(ORGANISM): Homo sapiens  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 13 ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n  
 配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid) 組織の種類(TISSUE TYPE): brain  
 鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single) 細胞の種類(CELL TYPE): glioma  
 トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear) セルライン(CELL LINE): NMC-G1  
 配列の種類 (MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein) 配列の特徴(FEATURE)  
 ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): No 1 Xaa = undetermined  
 アンチセンス(ANTI-SENCE): No 12 (Ser) = predicted  
 フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment 特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E  
 起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Xaa Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro (Ser) Leu  
 5 10。

【0074】配列番号(SEQ ID NO): 5 ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 23 組織の種類(TISSUE TYPE): brain  
 配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid) 細胞の種類(CELL TYPE): glioma  
 鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single) セルライン(CELL LINE): NMC-G1  
 トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear) 配列の特徴(FEATURE)  
 配列の種類 (MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein) 1 Xaa= Leu または Ala  
 ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): No 20 (Pro) = predicted  
 フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment 21 Xaa = undetermined  
 起源 (ORIGINAL SOURCE) 特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E  
 生物名 (ORGANISM): Homo sapiens

配列:

Xaa Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe  
5 10 15  
Gly Asn Val (Pro) Xaa Leu Leu  
20.

【0075】配列番号(SEQ ID NO): 6  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 25  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): Y e s  
アンチセンス(ANTI-SENCE): N o  
配列の特徴(FEATURE)  
11,14 I = inosine  
配列:  
AAGGATCCGT IGGIAAYTAY TTYGG 25.

【0076】配列番号(SEQ ID NO): 7  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 25  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid)  
配列:  
GGATCCGTGG GGAACATTT CGGGGTGCAG GATGCGGTCC CCTTCGGCAA CGTGAATTC 59.

【0078】配列番号(SEQ ID NO): 9  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 30  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): Y e s  
アンチセンス(ANTI-SENCE): N o  
配列:  
TGGGGAACATA TTTCGGGGTG CAGGATGCGG 30.

【0079】配列番号(SEQ ID NO): 10  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 30  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列:  
TATGTTAGGT GAAGTTGGGA ACTATTTCCG TGTGCAGGAT GCGGTAC 47.

【0081】配列番号(SEQ ID NO): 12  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 41  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列:  
CGCATCCTGC ACACCGAAAT AGTTCCCAAC TTCACCTAAC A 41.

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): Y e s  
アンチセンス(ANTI-SENCE): Y e s  
配列の特徴(FEATURE)  
14,20,23 I = inosine  
配列:  
AAGAATTCAC RTTICCRAAI GGIAC 25.  
【0077】配列番号(SEQ ID NO): 8  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 59  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 二本鎖 (double)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid)  
(PCR product from genomic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): N o  
アンチセンス(ANTI-SENCE): N o  
起源(ORIGINAL SOURCE)  
生物名(ORGANISM): Homo sapiens

配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): Y e s  
アンチセンス(ANTI-SENCE): Y e s  
配列:  
ACGTTGCCGA AGGGGACCGC ATCCTGCACC 30.  
【0080】配列番号(SEQ ID NO): 11  
配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 47  
配列の型(SEQUENCE TYPE): 核酸 (nucleic acid)  
鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)  
トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)  
配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): No  
アンチセンス(ANTI-SENCE): No

配列の種類 (MOLECULE TYPE): 他の核酸 (other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
ハイボセティカル配列(HIPOTHTICAL): No  
アンチセンス(ANTI-SENCE): Yes

【図面の簡単な説明】

【図1】ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ1）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図2】セファクリルS-200HRカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ3）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図3】ヘパリンセファロース（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ4）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図4】HR-894ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ5）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図5】Vydac C4高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ6）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図6】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図7】精製グリア活性化因子のグリア細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図8】NMC-G1由来精製グリア活性化因子のグリア細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図9】グリア活性化因子（NMC-G1由来）によるグリア細胞数の増加を示す図である。

【図10】グリア活性化因子（NMC-G1由来）によるグリア細胞へのトリチウムチミジン取り込み促進の経時変化を示す図である。●はGAF添加群を○はGAF無添加のコントロール群を示す。

【図11】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図12】NMC-G1由来精製グリア活性化因子の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図13】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図14】精製グリア活性化因子（NMC-G1由来）のラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対するトリチウム取り込み促進活性を示す図である。

【図15】グリア活性化因子（NMC-G1由来）活性の熱・酸安定性を示すグラフである。

【図16】aFGF、bFGFとグリア活性化因子（N

MC-G1由来）間の免疫学的交差性を示す図である。

【図17】GAF（NMC-G1由来）のビオチニル化コンカナバリンAおよびアビディンとビオチニル化ペルオキシダーゼを用いた染色の図である。

【図18】GAF（NMC-G1由来）のN-グリカナーゼ処理の結果である。

【図19】GAF cDNAの塩基配列とそれにより規定されるアミノ酸配列を示す図である。

【図20】pGAF1をCOS-7細胞で発現させ、グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した結果である。

【図21】プラスミドpDGAF1の構築を示す図である。

【図22】メトトレキセート耐性CHO細胞培養上清中に含まれるGAF活性を示す図である。

【図23】プラスミドpETGAF1の構築を示す図である。

【図24】MM294（DE3）/pLysS, pETGAF1の抽出物中に含まれるrhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図25】疎水カラムクロマトグラフィー（実施例7（3）ステップ2）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図26】ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例8-（3）ステップ3）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図27】精製rhGAFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図28】精製rhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図29】精製rhGAFのグリア細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図30】精製rhGAFの線維芽細胞株BALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図31】精製rhGAFのラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

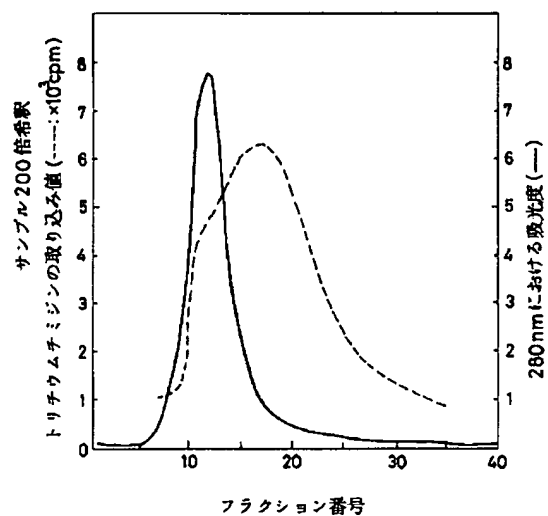
【図32】精製rhGAFのヒトさい帯血管内皮細胞増殖に対する作用を示す図である。

【図33】精製rhGAFのマウス骨髄細胞増殖に対する作用を示す図である。

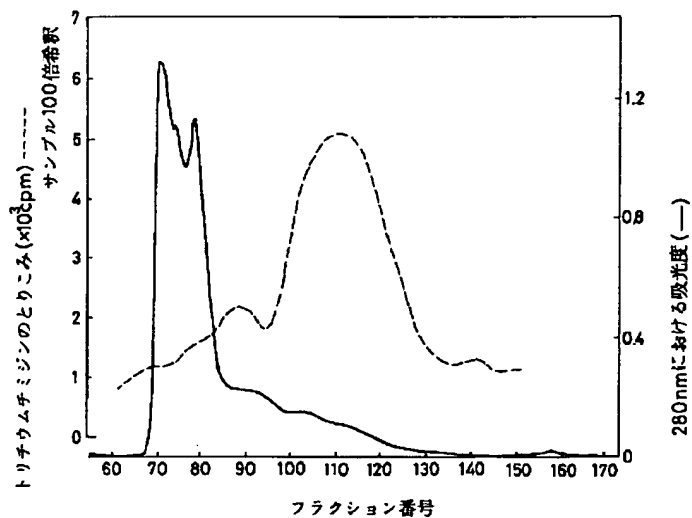
【図34】精製rhGAFのマウス骨髄細胞中巨核芽球に対する作用を示す図である。



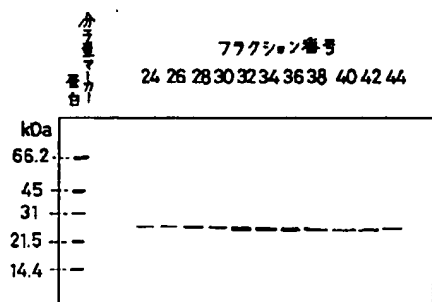
【図1】



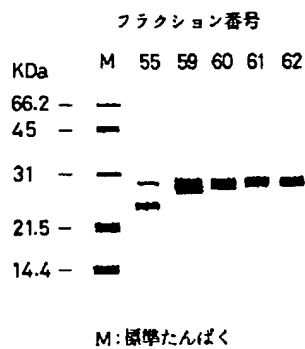
【図2】



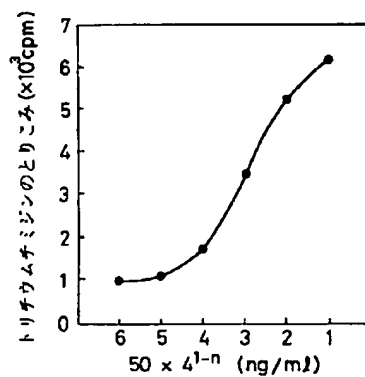
【図27】



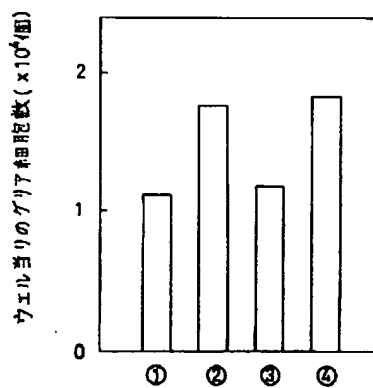
【図6】



【図7】

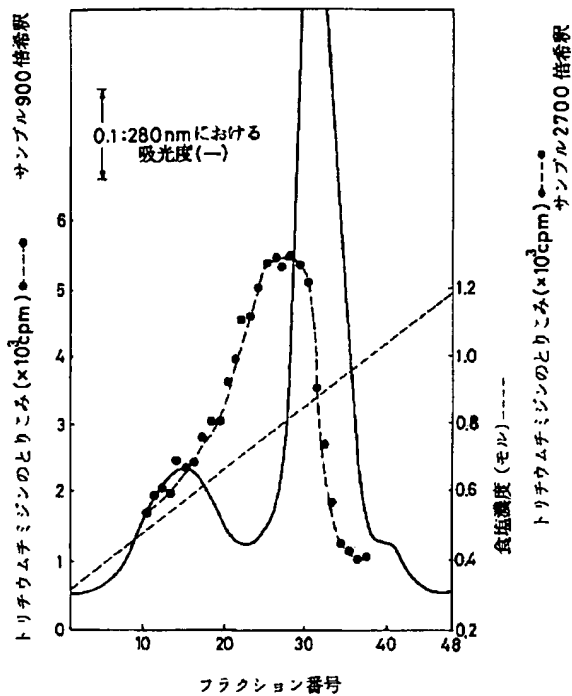


【図9】

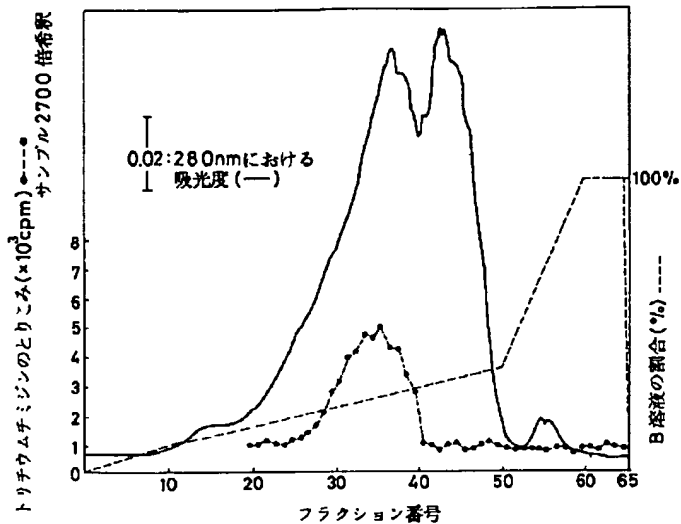


- ① 対照群
- ② GAF 添加群
- ③ ヘパリン添加群
- ④ GAF およびヘパリン添加群

【図3】

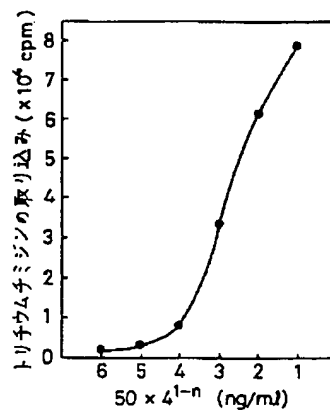
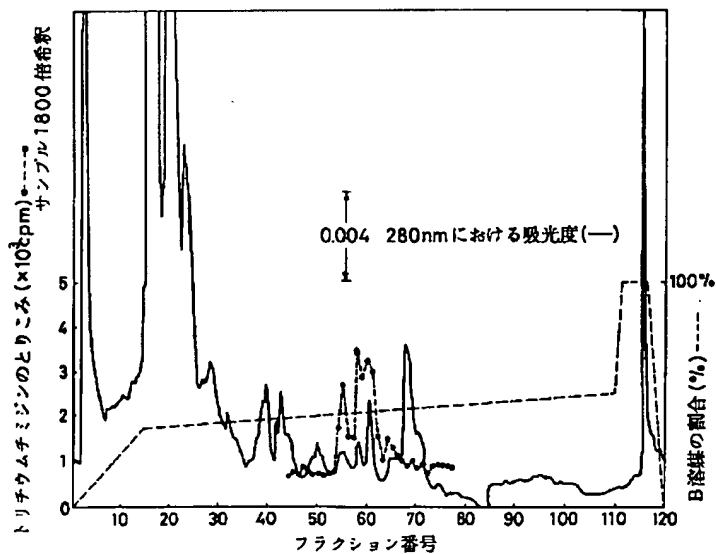


【図4】

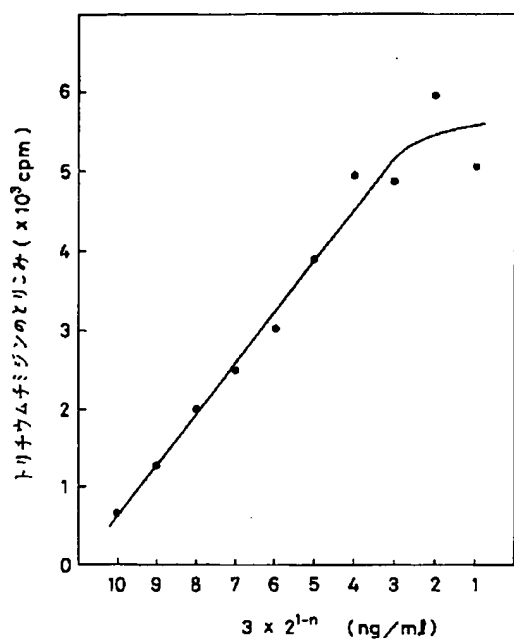


【図11】

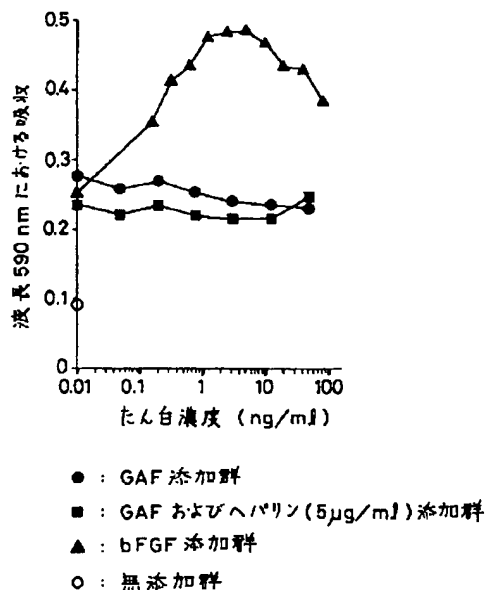
【図5】



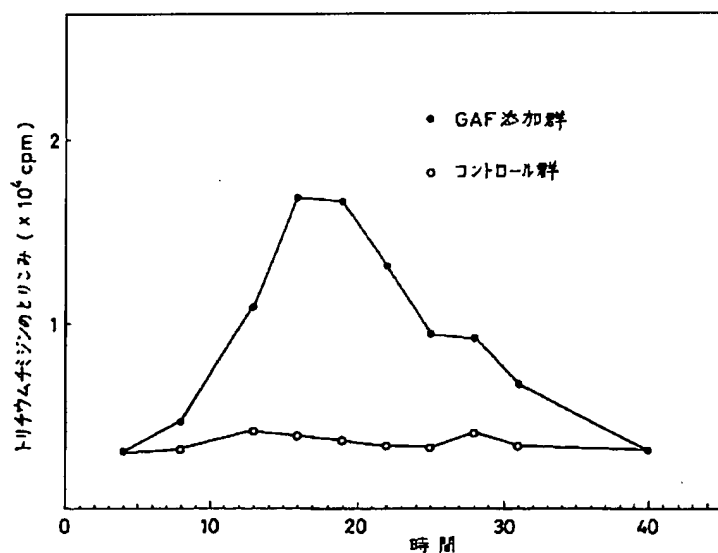
【図8】



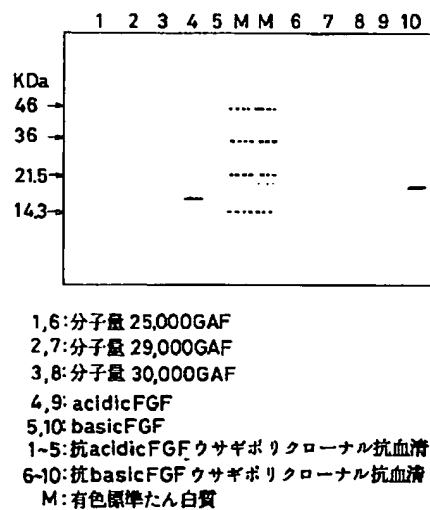
【図13】



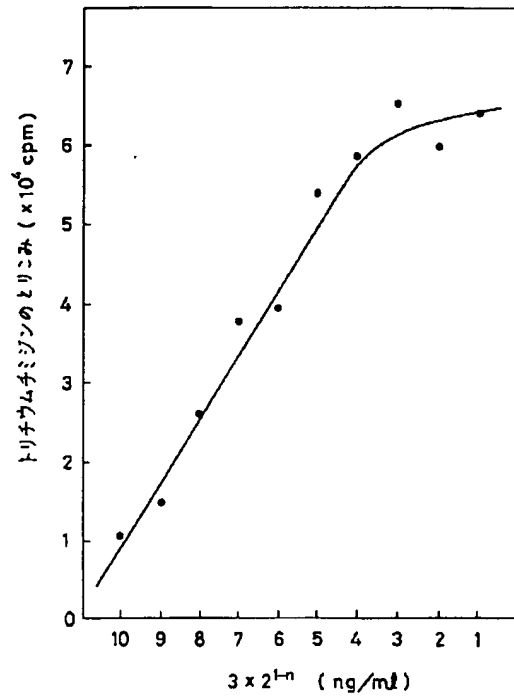
【図10】



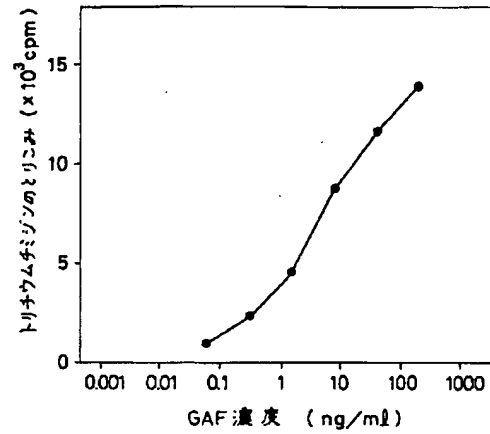
【図16】



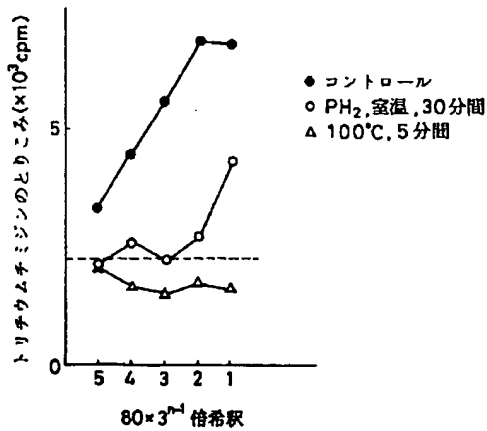
【図12】



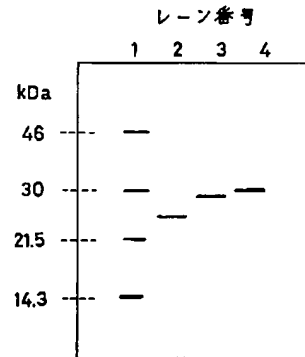
【図14】



【図15】

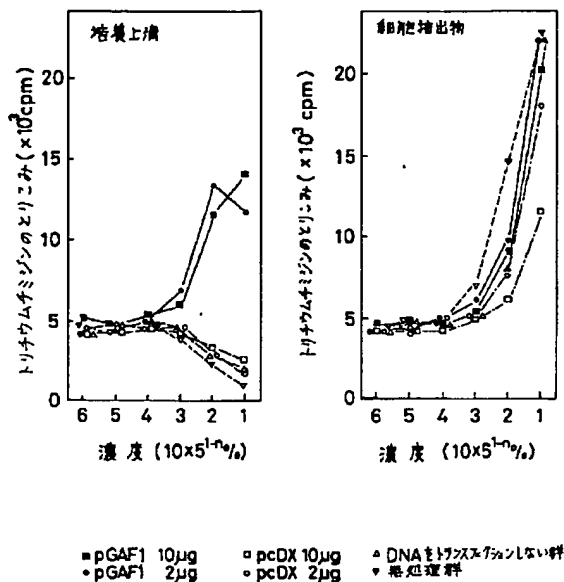
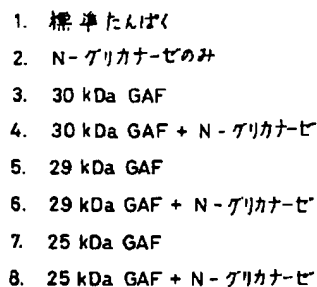


【図17】



1. 有色標準たんぱく (アマーシャム社製, 英国)
2. 25kDa GAF
3. 29kDa GAF
4. 30kDa GAF

【图20】



【图 19-2】

910 920 930 940 950 960  
CTCCACTGTTGCCAAACTTTGTCCCATGCATAATGTATGATGGAGGCTTGGATGGGAATA

970 980 990 1000 1010 1020  
TGCTGATTTTTGTTCTGCACTTAAAGGCTTCTCCTCCTGGAGGGCTGCCTAGGGCCACTTG

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
CTTGATTATCATGAGACAAGAGGAGAGACAGAGAGACTGAGCGCTAGGAGTGTTGTAT

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGTAGCGGGAGATGTGGCGGGAGCG

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
AGAGCAAAGGACTGCGGCCTGATGCATGCTGGAAAAAGACACGCTTTTCATTCTGATC

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
AGTTGTACTTCATCCTATATCAGCACAGCTGCCATACTTCGACTTATCAGGATTCTGGCT

1270 1280 1290 1300 1310 1320  
GGTGGCCTGCGCGAGGGTGCACTTACTTAAAAGACTTTCAGTTAATTCTCACTGGTAT

1330 1340 1350 1360 1370 1380  
CATCGCAOTGAACCTTAAGCAAAGACCCTCTTAGTAAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAATAA

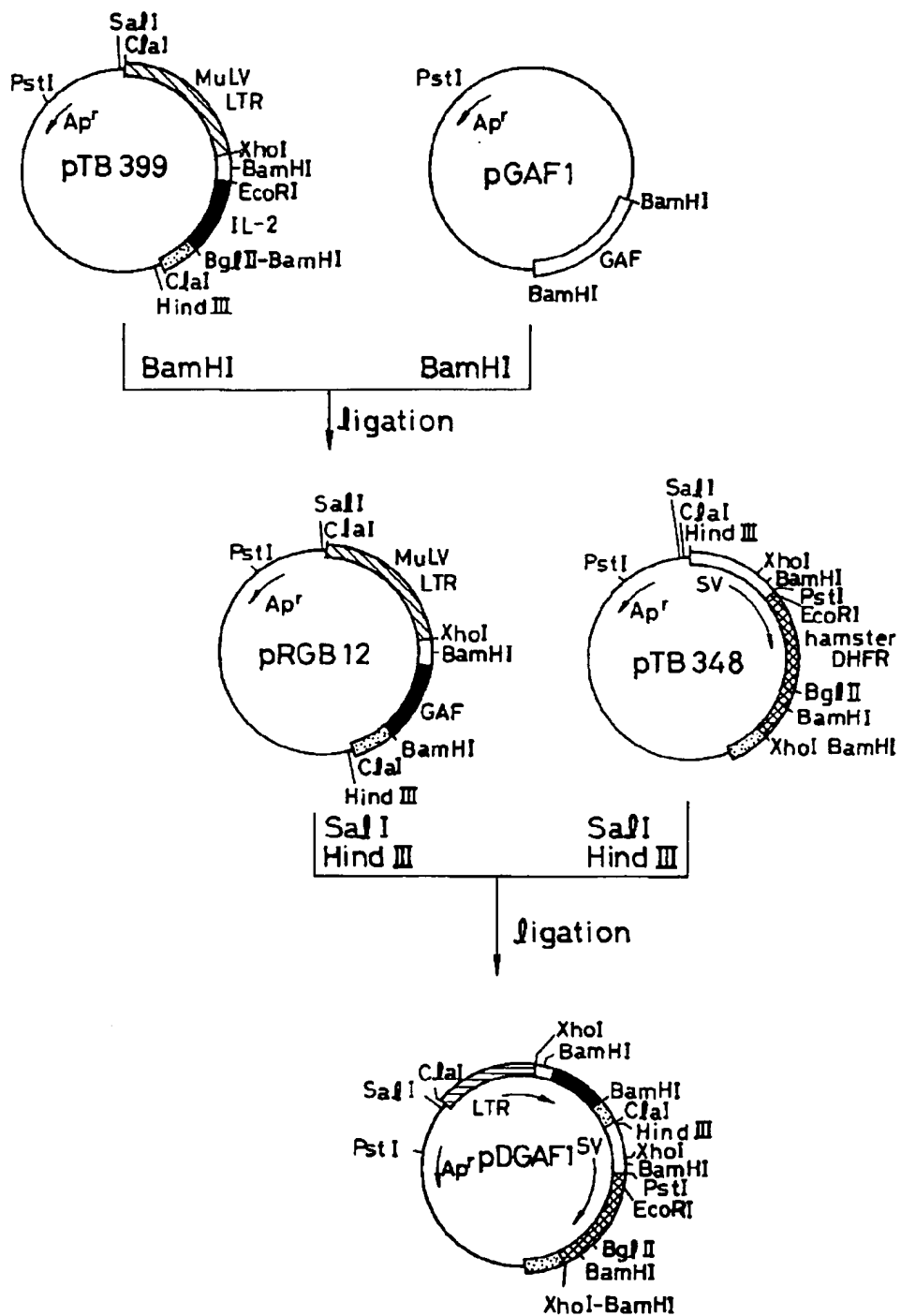
1390 1400 1410 1420 1430 1440  
AAATAAAAAAAGTTAAATTTATTTATAGAAATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

1450 1460 1470 1480 1490  
AAA

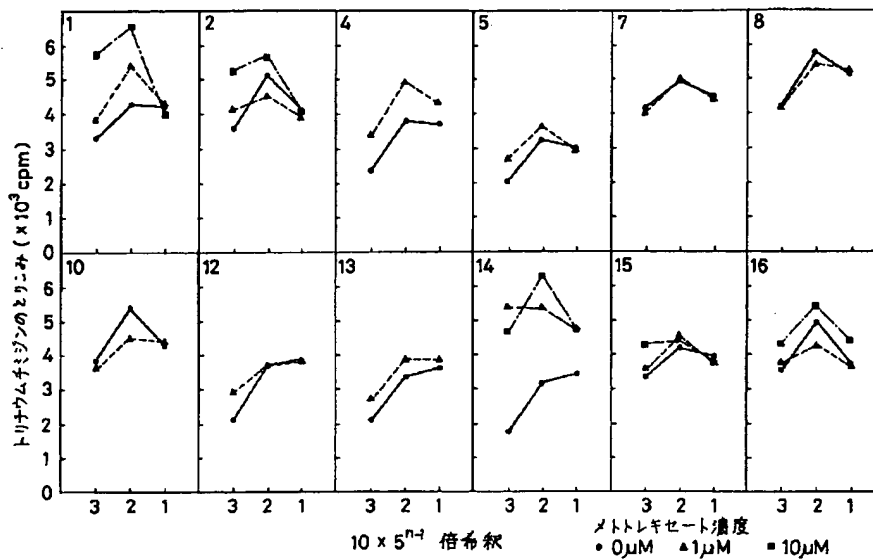
【图19-1】

10 20 30 40 50 60  
 TGAACAGCAGATTACTTTTATTTATGCATTTAATGGATTGAAGAAAAGAACCCTTTTTTT  
 70 80 90 100 110 120  
 TTCTCTCTCTCTGCAACTGCAGTAAGGGAGGGGAGTTGGATATACCTCGCCTAATATC  
 130 140 150 160 170 180  
 TCCTGGGTTGACACCATCATTATTGTTTATTCTTGTGCTCCAAAAGCCGAGTCCTCTGAT  
 Me  
 190 200 210 220 230 240  
 GGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAACCTATTTCCGGTGTGCAGGATGCCGTACCGTTTGGGAA  
 tAlaProLeuGlyGluValGlyAsnTyrPheGlyValGlnAspAlaValProPheGlyAs  
 250 260 270 280 290 300  
 TGTGCCCGTGTGCCGCTGGACAGCCCGGTTTTGTTAAGTGACCACCTGGGTCAGTCCGA  
 nValProValLeuProValAspSerProValLeuLeuSerAspHisLeuGlyGlnSerGln  
 310 320 330 340 350 360  
 AGCAGGGGGCTCCCCAGGGGACCCGAGTCACGGACTTGGATCATTTAAAGGGGATTCT  
 uAlaGlyGlyLeuProArgGlyProAlaValThrAspLeuAspHisLeuLysGlyIleLe  
 370 380 390 400 410 420  
 CAGGCGGAGGCAGCTATACTGCAGGACTGGATTTCACCTAGAAATCTTCCCCAATGGTAC  
 uArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPheHisLeuGluIlePheProAsnGlyTh  
 430 440 450 460 470 480  
 TATCCAGGGAACCCAGGAAAGACCACAGCCGATTGGCATTCTGGAATTTATCAGTATAGC  
 rIleGlnGlyThrArgLysAspHisSerArgPheGlyIleLeuGluPheIleSerIleAl  
 490 500 510 520 530 540  
 AGTGGGCGTGGTCAGCATTCCAGGCGTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAA  
 aValGlyLeuValSerIleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGlyMetAsnGluLy  
 550 560 570 580 590 600  
 GGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAACTAACCCAAAGAGTGTGTATTACAGAGAACAGTTCGA  
 sGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrGlnGluCysValPheArgGluGlnPheGl  
 610 620 630 640 650 660  
 AGAAAACTGGTATAATACGTACTCGTCAAACTATATAAGCACGTGGACACTGGAAGGCG  
 uGluAsnTrpTyrAsnThrTyrSerSerAsnLeuTyrLysHisValAspThrGlyArgAr  
 670 680 690 700 710 720  
 ATACTATGTTGCATTAAATAAAGATGGGACCCCGAGAGAAGGGACTAGGACTAAACGGCA  
 gTyrTyrValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgGluGlyThrArgThrLysArgHis  
 730 740 750 760 770 780  
 CCAGAAATTCACACATTTTTTACCTAGACCAAGTGGACCCGACAAAGTACCTGAACGTGA  
 sGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProValAspProAspLysValProGluLeuTy  
 790 800 810 820 830 840  
 TAAGGATATTCTAAGCCAAAGTTGACAAAGACAATTTCTTCACTTGAGCCCTTAAAAAG  
 rLysAspIleLeuSerGlnSerEnd  
 850 860 870 880 890 900  
 TAACCACTATAAAGGTTTCACCGCGTGGGTTCTTATTGATTGGCTGTGTATCACATCAG

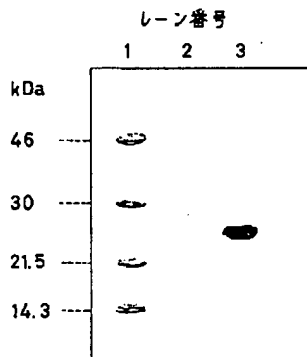
【図 2 1】



【図 2 2】

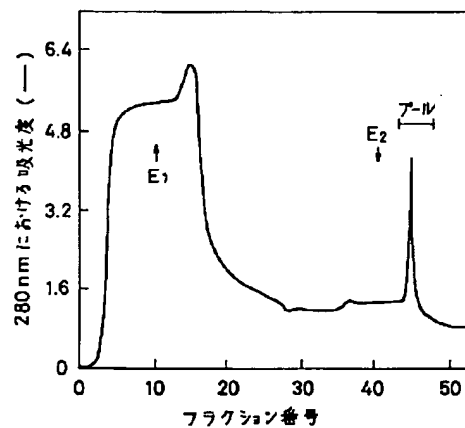


【図 2 4】



1. 有色標準たんぱく (アマーシャム社製, 米国)
2. MM294(DE3)/pLys, pET3-C抽出物
3. MM294(DE3)/pLys, pETGAF1の抽出物

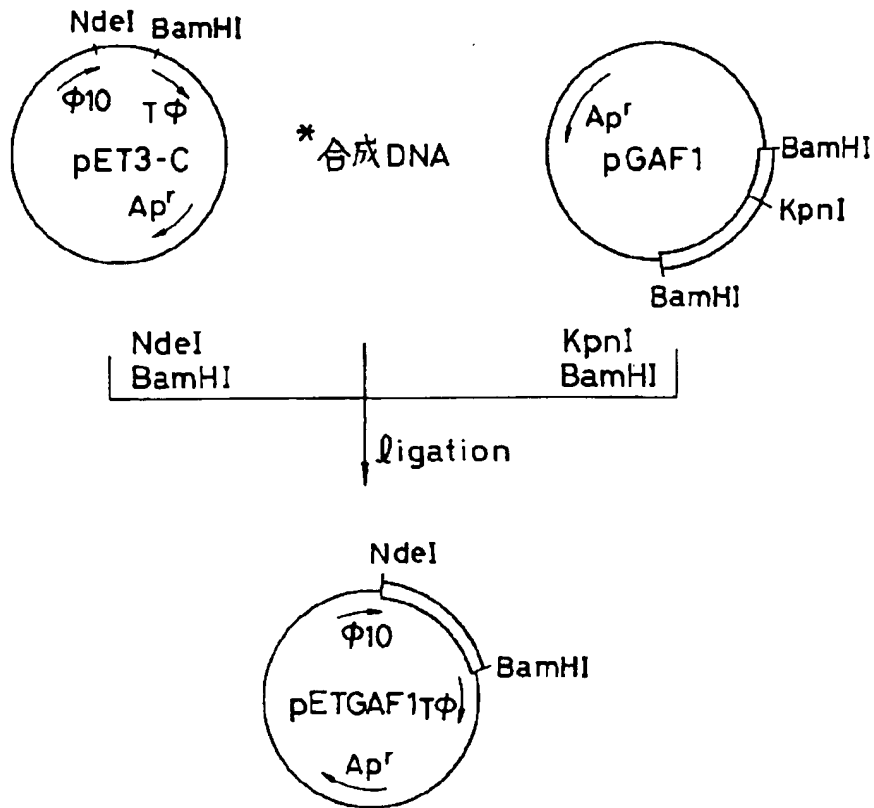
【図 2 5】



- E<sub>1</sub> : 12.5 % 飽和硫酸と 2 mM aPMSF を含む  
20 mM トリス塩緩衝液 (pH 7.6)
- E<sub>2</sub> : 15 % グセリン, 0.1 % CHAPS および 2 mM  
aPMSF を含む 20 mM トリス塩緩衝液 (pH 7.6)



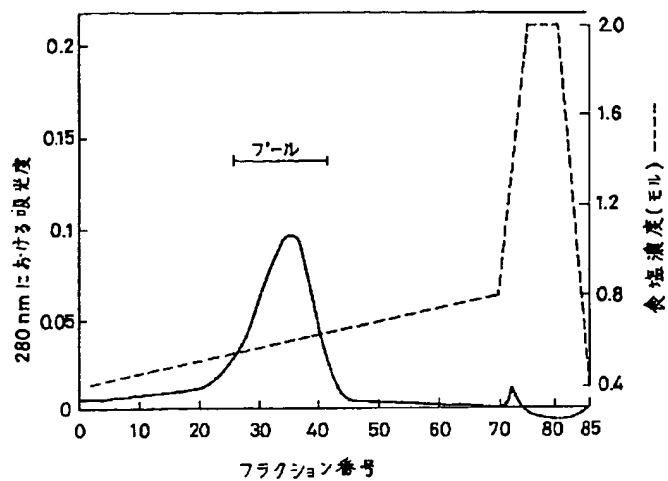
【図23】



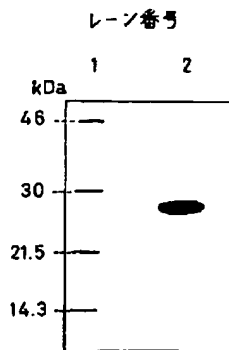
\*

5'-TATGTTAGGTGAAGTTGGGAAC TATTCGGTGTGCAGGATGCGGTAC-3'  
ACAATCCACTTCAACCCTTGATAAAGCCACACGTCCTACGC

【図26】



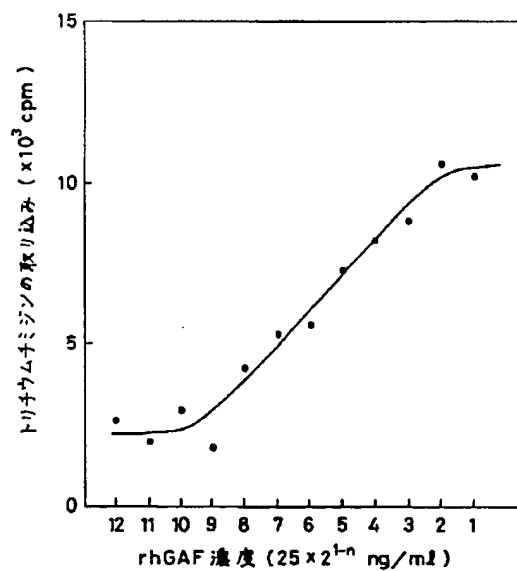
【図28】



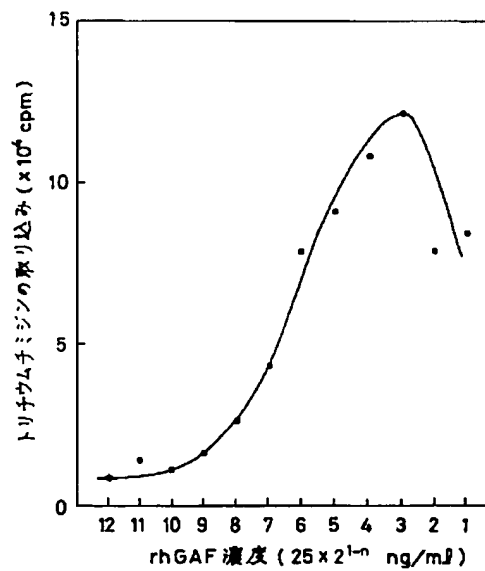
1. 有色標準たん白 (アマーシム社製、米国)

2. 精製 rhGAF

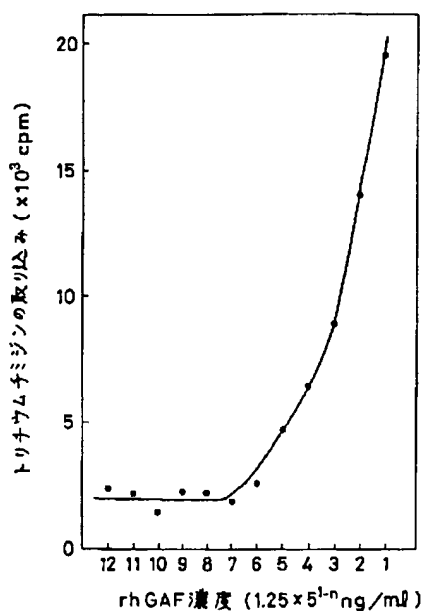
【図29】



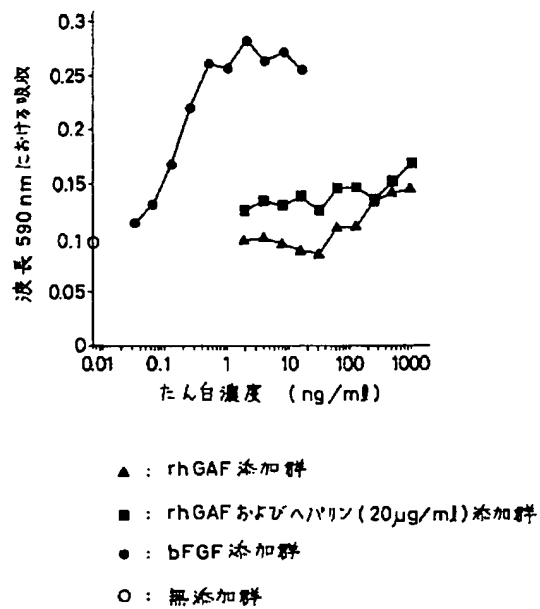
【図30】



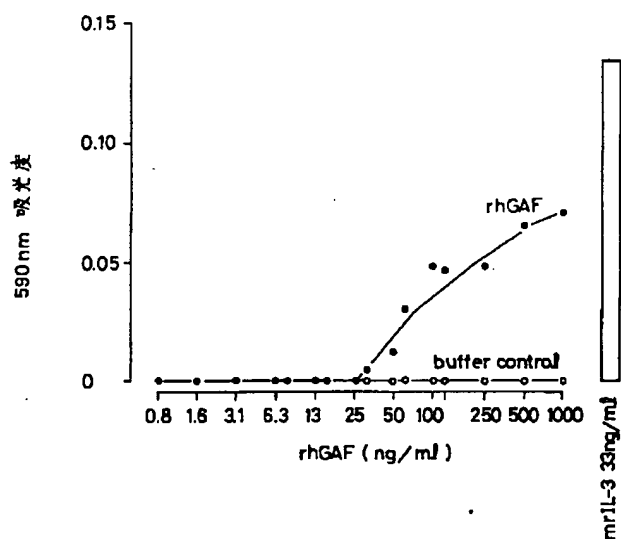
【図31】



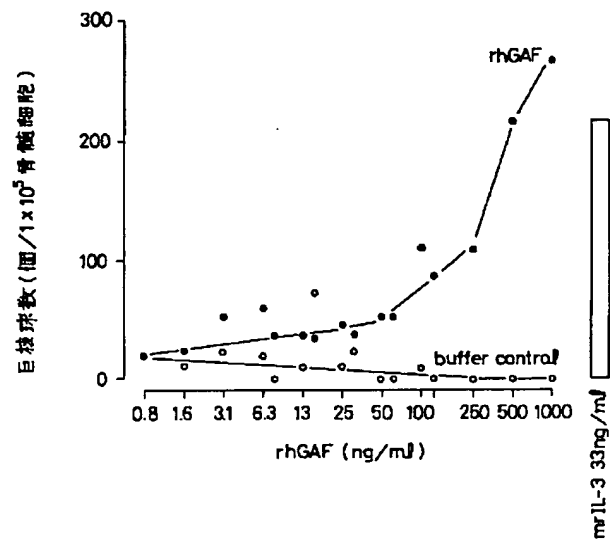
【図32】



【図33】



【図34】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/18	Z N A			
C 1 2 P 21/02		H 8214-4B		
// A 6 1 K 37/02	A A B	8314-4C		
	A D S			
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				

## GLIA-ACTIVATING FACTOR AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP5301893  
Publication date: 1993-11-16  
Inventor(s): NARUO KENICHI; others: 03  
Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD  
Requested Patent: ☐ JP5301893  
Application Number: JP19920003399 19920110  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07K13/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/18; C12P21/02  
EC Classification:  
EC Classification:  
Equivalents:

---

### Abstract

---

**PURPOSE:** To find out the new factor having a specific glia cell multiplication- stimulating action and a nutrient-activating action, and further to provide the method of efficiently producing the new factor.  
**CONSTITUTION:** A man-originated glioma cell strain is cultured, and the glia- activating growth factor is isolated from the supernatant of the culture solution and purified, while using the glia cell multiplication activity of rat brain cells as an indicator. The basic sequence of a cDNA coding the glia-activating growth factor and the amino acid sequence estimated from the basic sequence of the cDNA are clarified, and subsequently the GAF is expressed by a genetic engineering method. The obtained glia-activating factor is a new protein, has an activity to multiply the glia cells and fibroblasts, and can be expected as a medicine such as a cerebral disease-improving medicine.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**